Festschrift
zum fünfzigjährigen Jubiläum der Höheren Staatlichen Lehranstalt für Wein-, Obst- und Gartenbau zu Geisenheim am Rhein

---

Herausgegeben
vom Lehrkörper

3/358 80

Verlag der „Deutschen Wein-Zeitung“ und der Monatshefte „Wein und Rebe“, Mainz

Inhalts-Verzeichnis

Seite

Zum Geleit, von Dir. Prof. Dr. Fr. Muth, Geisenheim 5

Zur Geschichte der Anstalt, von Dir. Prof. Dr. Fr. Muth, Geisenheim 7

Weinbau, Reblausbekämpfung und Rebenveredlung im Rheingau, von Prof Dr. Karl Kroemer, Geisenheim 31

Der Stand der Versuchspflanzungen und die Versuchsergebnisse mit veredelten Reben an der höheren staatlichen Lehranstalt für Wein-, Obst- und Gartenbau zu Geisenheim a. Rh., von Weinbaulehrer Wilh. Biermann, Geisenheim 107

Über die sachgemäße Laubbehandlung bei der Rebenerziehungsart im Rheingau, von Weinbaulehrer Wilh. Biermann, Geisenheim . . . 127

Erfahrungen über Drahtanlagen bei der Rheingauer Rebenerziehungsart im Weingut der höheren staatlichen Lehranstalt für Wein-, Obst- und Gartenbau zu Geisenheim a. Rh., von Weinbaulehrer Wilh. Biermann, Geisenheim 138

Über im Sommer 1921 ausgeführte Bekämpfungsversuche gegen Peronospora, Oidium und Heu- und Sauerwurm, von Prof. Dr. G. Lüstner, Geisenheim 149

Die Fortschritte der Kellereiwirtschaft während der letzten Jahrzehnte, von Prof. Dr. C. von der Heide, Geisenheim 167

Weinentkeimung auf kaltem Wege durch Filtration. Ein neues Verfahren zur Behandlung krankheitsgefährdeter Weine, von Dr. Friedr. Schmitthenner, Kreuznach 212

Über die Verwendung von Milchsäure zur Darstellung von Obst-, Trester- und Drusenweinen, von Prof. Dr. Fr. Muth, Geisenheim . 222

Beobachtung über den Verdunstungsschwund des Weines, von Weinbaulehrer Wilh. Biermann, Geisenheim 254

Über eine in überschwefelten Mosten auftretende Hefe der Gattung Saccharomycodes, von Prof. Dr. Karl Kroemer und Dr. Fr. Heinrich, Geisenheim 258

Über die verschiedenen Entwicklungszustände der Weinhefen und ihre Merkmale, von Dr. E. Elßmann, Geisenheim 296

Zur Frage der Glykogenspeicherung bei den Weinhefen, von Dr. E. Elßmann, Geisenheim 310

Analyse und Bilanzierung der Wein- und Mostasche, von Prof. Dr. C. von der Heide, Geisenheim 315

Beiträge zum Nachweis der Zitronensäure im Wein und Most, von Prof. Dr. C. von der Heide und Dr. Hilde Straube, Geisenheim. . . 336

Seite

Degeneration, Sortenzüchtung und Sortenverbesserung im Obstbau. Ergebnisse der bisherigen Versuche auf dem Gebiete der Obstsortenzüchtung an der Geisenheimer Lehranstalt, von Garteninspektor E. Junge, Geisenheim 370

Zur Geschichte der Kleb- und Fanggürtel und Ergebnisse der Prüfung von Raupenleimen, von Prof. Dr. G. Lüstner, Geisenheim . . 455

Dendrologische Mitteilungen aus den Parkanlagen der höh. staatl. Lehranstalt für Wein-, Obst- und Gartenbau zu Geisenheim a. Rh., von Gartenbaudirektor F. Glindemann, Geisenheim 472

Ein Beitrag zur Kultur der Hortensien, von Gartenbaudirektor F. Glindemann, Geisenheim 506

Über einen pflanzenfressenden Marienkäfer (Epilachna argus), von Dr. Erich Schmidt, Geisenheim 512

Über Ascidienbildung am Efeu (Hedera Helix L.), von Prof. Dr. Fr. Muth, Geisenheim (mit 6 Abbildungen) 515

Siedlung und Gartenkultur, von Garteninspektor Arthur Glogau, Geisenheim 522

Bienenwirtschaftliche Beobachtungen im Rheingau, von Lehrer Stahl, Rüdesheim 544

Die Verwendung der Freilandstauden im Garten und Park, von Arthur Glogau, Gartenarchitekt und Leiter der Abteilung für Gartenkunst, Geisenheim (mit 19 Abbildungen) 551

Verzeichnis der früheren und jetzigen Beamten und Angestellten, zusammengestellt von Bürodiätar Karl Hachenberg 576

Verzeichnis der über 25 Jahre an der Anstalt beschäftigten Arbeiter 594

Ehrentafel der Gefallenen 595

Zusammenstellung der Veröffentlichungen von Angehörigen der Geisenheimer Lehranstalt in den Jahren 1872—1922, bearbeitet von Studienrat Karl Löckermann, Geisenheim 596

General-Register zu den Geisenheimer Jahresberichten von 1881—1919, zusammengestellt von Studienrat Karl Löckermann, Geisenheim 664

Druckfehlerberichtigung 734

Anzeigen-Anhang.

Über eine in überschwefelten Mosten auftretende Hefe der Gattung Saccharomycodes.

Von Prof. Dr. K. Kroemer und Dr. Fr. Heinrich.

Mit Tafel I.

Über den in Frage kommenden Sproßpilz haben wir bereits früher zwei kurzgefaßte Berichte[1]) veröffentlicht. Wir entdeckten den Pilz zuerst in einem Geisenheimer Most des Jahrgangs 1912 bei Versuchen, die über den Einfluß der schwefligen Säure auf die Weingärung Aufschluß geben sollten. Es wurden dabei 6 Reihen (I—VI) mit je 4 Flaschen aufgestellt, von denen jede 6 l Most enthielt. Während der Most in der Reihe I (Flasche 1 bis 4) im Naturzustande blieb, wurde er bei den übrigen Reihen (Flaschen 5—24) mit Kaliummetasulfit (Kaliumpyrosulfit $S_2O_5K_2$) in solchen Mengen versetzt, daß der Gehalt an schwefliger Säure betrug

bei	der	zweiten	Reihe	(Flaschen	5	bis	8)	26	mg	im l
„	„	dritten	„	(„	9	„	12)	52	„	„ „
„	„	vierten	„	(„	13	„	16)	104	„	„ „
„	„	fünften	„	(„	17	„	20)	312	„	„ „
„	„	sechsten	„	(„	21	„	24)	624	„	„ „

Die erste Flasche jeder Reihe überließen wir der Spontangärung, die zweite Flasche impften wir mit einem Tropfen, die dritte mit 1 ccm, die vierte mit 10 ccm dickbreiiger Bodensatzhefe aus einer Mostkultur der Weinheferasse Winningen.

Es ergab sich also folgende Versuchsanordnung:

---

[1]) Geisenheimer Jahresbericht 1912, S. 105; 1913, S. 122.

	Ohne Hefezusatz	Zusatz von 1 Tropfen Bodensatzhefe	Zusatz von 1 ccm Bodensatzhefe	Zusatz von 10 ccm Bodensatzhefe
	Flasche	Flasche	Flasche	Flasche
Reihe I ohne SO_2	1	2	3	4
Reihe II 26 mg SO_2 im l . .	5	6	7	8
Reihe III 52 „ „ „ „ . .	9	10	11	12
Reihe IV 104 „ „ „ „ . .	13	14	15	16
Reihe V 312 „ „ „ „ . .	17	18	19	20
Reihe VI 624 „ „ „ „ . .	21	22	23	24

Die Flaschen wurden in einem Raume aufgestellt, dessen Temperatur im allgemeinen zwischen 12 und 15° C schwankte. Bei den Versuchsreihen I—VI konnte schon am 3. und 4. Tage starke Kohlensäure-Entwicklung beobachtet werden, dagegen waren bei der Versuchsreihe V (Flaschen 17—20) in den ersten zwei Wochen Gärungserscheinungen nicht zu bemerken. Erst am 15. Tage traten sie in den Flaschen 17 (Spontangärung) und 20 (10 ccm Hefe) und am 19. und 20. Tage in den Flaschen 18 (1 Tropfen Hefe) und 19 (1 ccm Hefe) auf. Bei der Reihe VI blieb die Gärung anfangs vollkommen aus, nach drei Monaten aber stellte sich auch in den Flaschen dieser Reihe schwache Kohlensäure-Entwicklung ein. Die Gärung verlief hier aber sehr schleppend und kam erst nach 2 Monaten zum Stillstand.

Die Untersuchung der Organismenvegetation ergab, daß in der Reihe I—IV neben Weinhefen in ziemlich großer Menge Pseudosaccharomyces-Hefen zur Entwicklung kamen. Daneben machten sich in den ersten Tagen auch Zellen einer Saccharomycodes-Art bemerkbar, später jedoch ließ sich dieser Organismus in der Trubflora kaum noch nachweisen. Die übrigen Hefen hatten ihn jedenfalls bald unterdrückt. Die in dem Most reichlich vertretenen Pilzsporen gelangten nicht zur Keimung. Im allgemeinen lehrte das Ergebnis dieser 4 Versuchsreihen, daß der Zusatz von schwefliger Säure zum Most allein nicht ausreicht, die Weinhefen gegen den Wettbewerb anderer Gärungserreger zu schützen. Erst wenn zu den Mosten neben schwefliger Säure auch entwicklungsfähige, an dieses Gas angepaßte Weinhefen

in ausreichender Menge zugesetzt werden, tritt die Entwicklung der Gärungsschädlinge mehr zurück.

In den Flaschen 17, 18 und 19 der Versuchsreihe V (312 mg SO_2 im l) bestand der Organismentrub kurz nach Beginn der Gärung wie auch 14 Tage später fast nur aus den Zellen der bereits erwähnten Saccharomycodes-Art. Dagegen hatte sich in der Flasche 20 die zugesetzte Reinhefe so stark vermehrt, daß sie zunächst das ganze Vegetationsbild beherrschte. In allen Flaschen der Reihe V bildete sich über einer nicht zu dicken, festsitzenden und dunkler gefärbten Schicht von Bodensatzhefe nach und nach ein hellerer, ziemlich dicker Hefenring aus, der ausschließlich aus kräftigen Zellen der erwähnten Saccharomycodes-Art bestand. Auch sonst waren auf dem festsitzenden Trub höckerartige Auflagerungen solcher Hefemassen zu beobachten, die sich durchweg aus lebenskräftigen Saccharomycodes-Zellen zusammensetzten. Selbst in der Flasche 20, in der anfangs Saccharomycodes-Zellen überhaupt nicht entdeckt werden konnten, entwickelte sich ein derartiger Hefenring aus Saccharomycodes-Zellen, und außerdem entstand hier im Verlauf von 6 Wochen noch eine dünnere, die eigentliche Bodensatzhefe überziehende Hefendecke, in der gleichfalls nur Saccharomycodes-Zellen nachzuweisen waren.

In der Versuchsreihe VI war die Saccharomycodes-Art unter den Gärungserregern ebenfalls vorherrschend. In der Flasche 20 (Spontangärung) gelangten andere Organismen überhaupt kaum zur Entwicklung, während in den Flaschen 22—24 daneben noch auffallend viel Pseudosaccharomyces-Hefen und in geringer Menge auch Torula-ähnliche Sproßpilze zur Entwicklung kamen. Unstreitig hatte der hohe Gehalt an schwefliger Säure die Saccharomycodes-Hefen in der Vermehrung weniger behindert als die übrigen Gärungserreger des Mostes, jedoch verdient hervorgehoben zu werden, daß nach den Ergebnissen dieser Versuchsreihe offensichtlich einige Pseudosaccharomyces-Stämme und gewisse Torula-Arten gegen schweflige Säure ebenfalls verhältnismäßig unempfindlich sind.

Beachtenswert erschien von den Organismen vor allem die Saccharomycodes-Hefe. Sie wurde aus der Flasche 17 (Spontangärung 312 mg SO_2 im Liter) reingezüchtet, indem zunächst Plattenkulturen und hierauf absolute Reinkulturen (Tröpfchenkul-

turen nach P. Lindner[1]) angelegt wurden. Bei einer zweiten Folge derartiger Versuche, die in derselben Weise, aber mit geringeren Mengen von Most angestellt wurden, trat in allen Flaschen, die höhere Zusätze von Kaliummetasulfit erhalten hatten, als Gärungserreger fast ausschließlich wieder die in den ersten Versuchsreihen beobachtete Saccharomycodes-Hefe auf.

Sie scheint in Mosten überhaupt nicht selten zu sein, denn der eine von uns (Kr.) konnte sie in stark eingeschwefelten Rheingauer Mosten, die nachträglich in Gärung geraten waren, noch wiederholt beobachten. Auch in Mosten außerdeutscher Weinbaugebiete sind derartige Hefen festgestellt worden. Mensio[2]) fand sie in italienischen Mosten auf, die trotz erheblichen Gehaltes an schwefliger Säure nach einiger Zeit in Gärung gekommen waren. Der Trub der dabei entstandenen Weine enthielt neben elliptischen Hefen auch Zellen der Gattung Saccharomycodes. Mensio stellte Reinzuchten davon her und ermittelte, daß der von ihm isolierte Sproßpilz wie Saccharomycodes Ludwigii H. Glukose und Saccharose, nicht aber Maltose vergärt. Nach Mensio lag also eine mit Saccharomycodes Ludwigii H. verwandte Art vor. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Baragiola und Godet[3]) bei der Untersuchung von Weinen aus überschwefelten spanischen Mosten. Auch in diesen Weinen fand sich fast in allen Fällen eine Saccharomycodes-Art, die dadurch auffiel, daß ein Teil ihrer Zellen im Trub selbst deutlich Sporen gebildet hatte. Neben dieser Saccharomycodes-Hefe waren in den Weinen auch andere Gärungserreger von ungewöhnlichem Aussehen vertreten, u. a. „eine besonders auffallende kleine dickwandige Hefeart fast in Reinkultur", sodann „runde Zellen, die offenbar als Torula-Hefen angesprochen werden mußten". Ähnliche Organismen hat auch Martinand[4]) in stark eingeschwefelten Mosten als Gärungserreger nachgewie-

1) Lindner, P., Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. 3 Aufl. S. 148.

2) Mensio, C., Fermentazione di moste fortemente solforati. Di un nuovo fermento in enologia appartenente al genere Saccharomycodes. Le Staz. sperim. agrar. ital. *44*, 1911, S. 829–842.

3) Baragiola, W. J. und Ch. Godet, Weine aus überschwefelten Traubenmosten. Mitt. aus d. Gebiete d. Lebensmitteluntersuchung u. Hygiene, Bern. *3*, 1912, S. 105—111.

4) Martinand, V., Interprétation théorique des réactions qui s'opèrent dans la vinification en rouge à l'aide des composés sulfureux. Rev. de Vitic. *32*, 1909, S. 377.

sen, während er Saccharomycodes-Hefen darin anscheinend nicht beobachtet hatte. Bekannt ist das Vorkommen von S. Ludwigii Hansen in gärenden Eichenschleimflüssen [1]). Lindner [2]) hat diese Art auch massenhaft in bosnischen Pflaumenmaischen angetroffen und außerdem festgestellt, daß sie in den dicken lederartigen Pilzhäuten, die in Kurland auf gesüßtem Tee gezüchtet und als Heilmittel verwendet werden („Medusenthee") ebenfalls reichlich auftritt.

Erwähnenswert ist schließlich noch Saccharomycodes Behrensianus Kl. [3]), den J. Behrens [4]) auf Hopfen nachgewiesen hat. Abgesehen von der kurzen Mitteilung Mensios liegen bisher genauere Angaben über die Merkmale der im Wein vorkommenden Saccharomycodes-Formen nicht vor. Daher erschien eine gründliche Untersuchung der von uns aufgefundenen Saccharomycodes-Art angezeigt.

I. Morphologie.

1. Form, Größe und Inhalt der Zellen.

Die Form der Zellen in 3 Tage alten Mostkulturen [5]) ist sehr gleichmäßig (Fig. 1, Taf. I). Es treten entweder nur langgestreckt zitronenförmige Zellen oder Übergangsstadien zur Zitronenform auf. Die frisch abgestoßenen oder noch lose der Mutterzelle anliegenden Sprosse sind ei- bis ausgeprägt birnförmig. Der der Mutterzelle zugekehrte Pol ist ebenso wie das eine Mutterzellenende, an dem die Zellneubildung stattfand, infolge der Trennung von Mutter- und Tochterzelle durch Querwandbildung mehr oder weniger abgeplattet. Bei der weiteren Entwicklung der Tochterzelle rundet sich auch dieser Pol mehr und mehr ab, die Zelle wird oval oder langgestreckt eiförmig und nimmt dann sehr bald die typische Zitronenform an. In diesem Stadium beginnt auch die Tochterzelle auszusprossen.

---

1) Hansen, E. Chr., Über die in dem Schleimflusse lebender Bäume beobachteten Mikroorganismen. Zentralbl. f. Bakt. *5*, 1889, S 632.

2) Lindner, P., Die vermeintliche neue Hefe Medusomyses Gisevü. Ber. d. Deutsch. Botan. Gesellsch. *31*, 1913, S. 364, 367.

3) Klöcker, A., in: Lafar, Handbuch d techn. Mykologie, *4*, S. 183. Jena 1905—1907.

4) Behrens, J., Wochenschr. f. Brauerei, *13*, 1896, S. 802.

5) Bei sämtlichen Versuchen wurde von 3—4 Tage alter Bodensatzhefe ausgegangen.

Die Entstehung der neuen Knospe erfolgt dabei regelmäßig zuerst an dem Pole, der der Mutterzelle zugekehrt war. Nur wenn die Tochterzellen mit der Mutterzelle noch in Verbindung bleiben, sprossen sie zuerst an dem von der Mutterzelle abgekehrten Pole aus. Die vor der Abstoßung der jungen Sprosse eintretende Querwandbildung ist in vielen Fällen sehr deutlich zu erkennen. Häufiger kommt es vor, daß die Tochterzelle mit der Mutterzelle längere Zeit verbunden bleibt, so daß sie schließlich ebenso groß ist wie diese. Solche Zellen sind dann hantelförmig und meist durch deutliche Querwandbildung ausgezeichnet (Fig. 1, 3c, 4a—c, Taf. I). Ganz selten ist der Fall, daß auch hantelförmige Zellen junge Sprosse anlegen, die, noch mit der Mutterzelle verbunden, bis zur ursprünglichen Größe heranwachsen. Wurstförmige Zellen kommen nicht vor oder sind äußerst selten.

Die ei- bezw. birnförmigen jungen Sprosse sind meist gegen 7,4 : 6,3 μ groß, die völlig ausgewachsenen, länglich-ovalen bis langgestreckt zitronenförmigen sowie hantelförmigen Zellen messen im Mittel 18,6 : 6,1 μ, während die zwischen jungen Sprossen und ausgewachsenen Zellen stehenden Entwicklungsstadien im Mittel eine Größe von 9,3 : 4,0 μ aufweisen. Verglichen mit der normalen Größe anderer Saccharomyceten weist dieser Pilz ganz beträchtliche Abmessungen auf.

Der Zellinhalt ist in 3 Tage altem Zellenmaterial in bezug auf sein Lichtbrechungsvermögen ähnlich dem anderer Saccharomyceten. Charakteristisch sind zahlreiche, stark hervortretende Granula (Fig. 2—4, 24—34, Taf. I), die häufig einen Durchmesser von 1 μ erreichen oder noch größer werden und, nebenbei bemerkt, in Gipsblockkulturen kurz vor der Sporenbildung sowie in Most- oder Würzegelatinekulturen am deutlichsten in Erscheinung treten. Sie färben sich mit Osmiumsäure schwarzbraun und sind jedenfalls fetthaltig. Vakuolen sind in den jungen (nur 3 Tage alten) Zellen nur sehr schwer zu erkennen. Sie scheinen meistens in größerer Anzahl vorhanden und von rundlicher Form zu sein. Besser treten sie nach Behandlung der Zellen mit Jod hervor, sofern sie nicht durch zu großen Glykogenvorrat schon verdeckt sind.

Die Zellwandung ist im Verhältnis zu der der übrigen Saccharomyceten ziemlich dick, stark lichtbrechend, zerreißt aber

verhältnismäßig leicht. Unter gewissen Ernährungsbedingungen, wie sie sich bei den Assimilationsversuchen einstellten, treten in den Zellen sehr große Vakuolen auf. Meist ist in solchen Fällen nur ein einziger großer Saftraum vorhanden, der die Zelle fast ganz ausfüllt und von der Zellwand nur durch einen schmalen, 1 bis mehrere μ dicken, stark lichtbrechenden Plasmaschlauch getrennt ist. Daneben kommt es auch vor, daß eine Zelle zwei solcher Vakuolen enthält.

2. Wachstumserscheinungen in flüssigen und auf festen Nährböden.

A. Tröpfchenkulturen in Most und ungehopfter Würze.

In Tröpfchenkulturen (Fig. 2a—4c, Taf. I) erfolgt die Bildung neuer Zellen fast regelmäßig an einem der beiden Pole der Mutterzelle. Seltener brechen die jungen Sprosse seitlich an der Mutterzelle hervor. Gleichzeitige Entstehung von zwei neuen Zellen an einer engbegrenzten Stelle der Mutterzelle konnte in den Tröpfchenkulturen nicht beobachtet werden. Die Anlage der neuen Sprosse erfolgt mit breiter Basis. Dabei ist die Querwandbildung häufig auch dann schon deutlich zu sehen, wenn die in Entstehung begriffenen Zellen noch sehr klein sind. Die Trennung der jungen Sprosse von der Mutterzelle nach eingetretener Querwandbildung geht ganz ähnlich wie bei den Apiculatus-Hefen in der Weise vor sich, daß die neugebildeten Zellen rechtwinklig zur Mutterzelle umknicken. Sie bleiben dann, wahrscheinlich mittels einer schleimigen Substanz, noch eine Zeitlang lose mit der älteren Zelle in Verbindung. In dieser Lage rundet sich zunächst das der Mutterzelle zugekehrte, anfangs abgeplattete Zellende, ebenso wie das entsprechende Ende der Mutterzelle ab, und die neugebildete Zelle wird dann entweder ganz von der Mutterzelle abgestoßen, oder sie beginnt, solange sie noch lose mit dieser verbunden ist, selbst auszusprossen. Häufig kommt es auch vor, daß die Enden der zitronenförmigen Zellen, die sonst in der Neubildung von Sprossen aufgehen, erhalten bleiben. Unmittelbar hinter dem jungen Sproß ist dann das Ende der Mutterzelle angeschollen, und diese besitzt, besonders wenn deutliche Querwandbildung vorhanden ist, die Gestalt eines Spielkegels (Fig. 1a u. 4b, Taf. I).

In 5 Tage alten Tröpfchenkulturen sind die im übrigen regelmäßigen, rundlichen Kolonien nicht besonders stark und konisch in die Tiefe gewachsen. Mit ihrer Basis füllen sie fast den ganzen Tropfen aus, sie wachsen also weit mehr in die Breite als in die Tiefe. Die an und für sich schon ganz kleinen Zellverbände fallen frühzeitig auseinander. Riesenzellen waren in den Kolonien unserer Tröpfchenkulturen nicht zu finden, desgleichen traten wurstförmige Zellen überhaupt nicht oder nur ausnahmsweise auf. In mit Most angelegten Adhäsionskulturen[1]) waren derartige Zellen neben mehr oder weniger abnorm geformten öfter zu sehen. Bemerkt sei noch, daß in mehreren Tröpfchen nach 7 Tagen reichliche Sporenbildung beobachtet werden konnte und daß die Sporen nach dieser Zeit häufig schon im Auskeimen begriffen waren. Ähnlich wie in Most entwickeln sich die Kolonien auch in Tröpfchen von ungehopfter Würze. Die Zellen zeigten hier nach zwei Wochen große, deutlich hervortretende Vakuolen.

In größeren Mengen von Most bei Kultur in ½—1 Liter-Gefäßen und in Reagenzgläsern entstehen sehr gleichmäßige und festliegende Bodensätze.

B. Einzellkulturen in Mostgelatine.

Die Kulturen wurden in feuchten Kammern nach Fritsch mit 10 prozentiger Mostgelatine angelegt. Die Sprossung erfolgte ganz ähnlich wie in den Tröpfchen. Die herangewachsenen Kolonien waren meist sehr regelmäßig wie der Typus I (Maulbeerform) oder unregelmäßig mit regelmäßigem Kern wie der Typus II nach Will[2]). Die näher untersuchten Kolonien enthielten nur äußerst wenige oder überhaupt keine wurstförmigen Zellen; das Zellenmaterial zeigte gegenüber demjenigen in Most- und Würzekulturen kaum Unterschiede.

C. Riesenkolonien auf Mostgelatine.

Morphologie. Riesenkolonien, die nach den Angaben von Lindner[3]) auf Mostgelatine angelegt wurden und sich

---

1) Lindner, P., Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben, 3. Aufl., Berlin 1901, S. 265.

2) Will, H., Anleitung zur biologischen Untersuchung und Begutachtung von Bierwürze usw., München u. Berlin 1909, S. 83.

3) Lindner, P., Wochenschr. für Brauerei, Bd. 10, 1893, S. 692; vergl. auch Will, a. a. O., S. 117.

bei einer Temperatur von 20—22 ° C entwickelten, zeigten nach 6 ½ Wochen folgendes Aussehen: Oberflächenbelag in der zentralen Partie mit höckerförmiger Erhebung, im übrigen ganz flach ausgebreitet. Strombildung vorhanden, aber nicht immer besonders deutlich ausgeprägt und nur einzelne Sektoren in der Randpartie schärfer hervortretend. Der äußere Rand des Oberflächenbelages ist sehr fein gefranst. Zwischen äußerer Randpartie und zentraler Partie sind einzelne ziemlich kleine warzenförmige, weißlich gefärbte Erhabenheiten zu bemerken. Anhänge kaum sichtbar. Farbe der zentralen Partie weiß, die der Randpartie grau. Oberfläche matt. Durchmesser der Kolonien 10—12 mm. Sie zeigen die Grundform Ia. nach Will[1]).

Anatomie. In der zentralen Partie finden sich neben Zellen der gewöhnlichen charakteristischen Formen viele von abnormer Gestalt (Fig. 5—10, Taf. I), sowie vereinzelt langgestreckt wurstförmige Zellen. Der Zellinhalt ist meistens stark granuliert oder geschrumpft und abgesvorben (Fig. 7, Taf. I). Zellen mit in Auflösung begriffenen Wandungen sind sehr häufig. Vereinzelt treten unförmige Riesenzellen von verschiedener Gestalt auf. Sie scheinen durch Verschmelzung mehrerer in Auflösung begriffener Zellen entstanden zu sein und sind, nach der Beschaffenheit ihrer Wandungen und ihres Zellinhaltes zu schließen, sehr wahrscheinlich tot oder zum mindesten in den Dauerzustand eingetreten (Fig. 5 u. 6, Taf. I). Bei rundlicher Form besitzen sie oft einen Durchmesser von 18 μ und darüber. Zahlreiche Zellen der zentralen Partie enthalten Sporen. Glykogen ist nur vereinzelt nachzuweisen, in den meisten Zellen fehlt es.

Das Zellenmaterial in der Randpartie (Fig. 11—18, Taf. I) ist im allgemeinen viel kräftiger als das in der zentralen Partie. Tote Zellen sind hier seltener. Die Zellform, die in den Randschichten vorherrscht, stellt eine Übergangsstufe von der Zitronen- zur Wurstform dar. Charakteristisch sind zahlreiche Zellen mit seitlich hervorbrechenden Sprossen, wie sie auch in den zentralen Partien, jedoch weniger häufig vorkommen (Fig. 13, Taf. I). Dabei ist der Fall, daß an einer engbegrenzten Stelle der Mutterzelle gleichzeitig drei Sprosse hervorbrechen („Kronenbildung") nicht selten (Fig. 11 u. 14, Taf. I). Die bereits früher genannten Granula treten hier, wie in den meisten Zellen der

[1]) Will, H., a. a. O., S. 108, Taf. I.

Riesenkolonie, scharf ausgeprägt hervor. Sporenbildende Zellen konnten wir in den Randpartien dagegen nicht beobachten. Die Glykogenreaktion der Zellen war schwach bis deutlich.

Die vorherrschende Zellform auf der Unterseite der Kolonie bezw. der Anhänge war die wurstförmige (Fig. 19, Taf. I). Die Zellen zeigten hier meist sehr kräftige Glykogenreaktion. Sporenbildung konnte an dieser Stelle nicht beobachtet werden.

Das Zellenmaterial in den zwischen Rand und zentraler Partie liegenden warzenförmigen Erhebungen war ähnlich beschaffen wie in der äußeren Randpartie.

Auffallend ist die Erscheinung, daß die Zellen in den Riesenkolonien im Durchschnitt merklich größer sind als in Flüssigkeitskulturen. Besonders in den Anhängen zeigen die dort vorherrschenden, wurstförmigen Zellen ganz beträchtliche Abmessungen. Zellen von 30 μ Länge und 8 μ Dicke sind hier eine häufige Erscheinung. Daneben fehlt es allerdings auch nicht an kleineren Zellen, wie sie für die Flüssigkeitskulturen charakteristisch sind, doch treten diese Zellen an Zahl gegen die anderen sichtlich zurück.

D. Riesenkolonien auf ungehopfter Würzegelatine.

M o r p h o l o g i e. Charakteristisch für die Riesenkolonien auf ungehopfter Würzegelatine ist, daß nach etwa einmonatlichem Alter am Oberflächenbelage derselben große lappenförmige Ströme ungleichmäßig, d. h. nur an vereinzelten Stellen oder gar nur an einem Punkte hervorbrechen. Im übrigen ist der Oberflächenbelag flach ausgebreitet und glatt. Durchmesser der Kolonien nach einem Monat 10 mm, nach zwei Monaten mit den Strömen 21 mm. Äußerer Rand leicht gefranst. Anhänge nicht sichtbar. Oberfläche der Kolonie trocken und matt, äußere Randpartie glasig.

A n a t o m i e. In der zentralen Partie kommen neben Zellen von der charakteristischen Form sehr viel langgestreckte, wurstförmige Zellen vor, die häufig zu mycelartigen Verbänden mit meist deutlichen Querwänden vereinigt sind (Fig. 20 u. 21, Taf. I). „Kronenbildung" kommt öfter vor. Abnorm geformte Zellen treten in größerer Zahl auf (Fig. 23, Taf. I). Sporenbildende Zellen sind sehr zahlreich (Fig. 22, Taf. I). Vereinzelt kräftige Glykogenreaktion.

Das Zellenmaterial in der Randpartie (Fig. 24—30, Taf. I) ist ähnlich beschaffen wie bei den Riesenkolonien auf Mostgelatine, doch sind wurstförmige Zellen etwas seltener zu beobachten. Die Sporenbildung ist hier noch stärker ausgeprägt als in der zentralen Partie (Fig. 30, Taf. I). Die meisten Zellen ergaben deutliche bis kräftige Glykogenreaktion.

Die Unterseite der Kolonie ist ähnlich zusammengesetzt wie die Randpartie, nur zeigen die Zellen hier bei deutlich nachweisbarem Glykogengehalt im allgemeinen schwächere Granulation und nicht so häufig Sporenbildung. Auch hier sind die Zellen durchschnittlich merklich größer als in Flüssigkeitskulturen.

E. Stichkulturen in Mostgelatine.

In der etwa 5 cm hohen Gelatineschicht zeigte sich der Stichkanal nach drei Tagen bis zu einem Drittel seiner Länge bewachsen. In einen Monat alten Kulturen reichte der bewachsene Teil des Stichkanals fast bis auf den Grund des Reagenzglases. Die äußeren Wachtumserscheinungen waren ganz ähnlich wie bei den übrigen Saccharomyceten.

Ähnlich wie in den Riesenkolonien wiesen auch in den einen Monat alten Stichkulturen die Zellen (Fig. 31—34, Taf. I) durchschnittlich größere Abmessungen auf als in Flüssigkeitskulturen. Meist waren sie nicht kleiner als 8,1 : 7,1 μ und erreichten in der Regel eine Größe von etwa 13,5 : 9,0 μ. Nicht selten fanden wir in den Stichkulturen auch wurstförmige Zellen, die gegen 25,4 μ lang und 6,3 μ breit, zum Teil auch noch größer waren.

F. Kulturen mit gleichmäßiger Verteilung der Hefe in 10 prozentiger Mostgelatine.

In drei Wochen alten Kulturen hatte an der Oberfläche der Gelatine äußerst kräftige Entwicklung stattgefunden. Der übrige Teil der Gelatine war ganz schwach, aber sehr gleichmäßig getrübt. In bezug auf sein Luftbedürfnis dürfte dieser Saccharomycodes demnach als fakultativ anaërob angesehen werden. In vier Wochen alten Kulturen hatte sich die kräftig bewachsene Oberfläche der Gelatine stark eingesenkt, ohne daß Verflüssigung eingetreten war. Oberflächenkulturen auf schräg erstarrter Gelatine zeigten käsige Beschaffenheit.

3. Hautbildung.

Unter Beachtung der von Will[1]) für die Hautbildung angegebenen Bedingungen wurde folgende Versuchsanstellung gewählt: 150 ccm fassende Erlenmeyerkolben wurden mit je 50 ccm ungehopfter Würze von 9,6° Ball. beschickt und vorschriftsmäßig sterilisiert. Nachdem die Kolben mit der Würze zum Zweck der Lüftung noch einige Tage im Laboratorium gestanden hatten, wurden in jeden Kolben je 2 Platinösen Bodensatzhefe eingeimpft. Die Kulturen blieben dann bei einer Temperatur von 21—22° C an einem ruhigen Platze stehen. Nach 5 Tagen zeigten sich an der Flüssigkeitsoberfläche die ersten Anfänge einer Ringbildung. Nach einem Monat hatte sich ein mäßig starker Hefenring gebildet. Hautinselchen waren nicht zu sehen, auch nicht in 2 und 3 Monaten alten Kulturen. In dem 1 Monat alten Hefenring war die charakteristische Zellform des Pilzes vorherrschend (Fig. 41, Taf. I). Ausgesprochen wurstförmige Zellen traten ebenfalls, wenn auch seltener, in Erscheinung, ebenso fehlte es nicht an abnormen oder mycelartig geformten Zellen (Fig. 35, 37 u. 38, Taf. I). In einer verhältnismäßig großen Zahl von Zellen war Sporenbildung (Fig. 42, Taf. I) zu beobachten, während Kronenbildung seltener vorkam. Die Sporen keimten häufig schon im Ring aus, meist unregelmäßig geformte, oft sehr lange und gewundene Keimschäuche bildend (Fig. 39, 40 u. 43, Taf. I).

In der Bodensatzhefe von vier Wochen alten Hautkulturen herschten langgestreckte, wurstförmige Zellen vor, welche die charakteristische Form häufig noch etwas erkennen ließen und meist entweder rundliche oder unregelmäßig geformte Vakuolen enthielten.

In 2 Monate alten Kulturen hatten sich die Verhältnisse sowohl im Ring als auch im Bodensatz kaum geändert. Im Hefenring konnten nach dieser Zeit vereinzelt meist zitronenförmige Riesenzellen beobachtet werden. Abnorm geformte Riesenzellen waren sehr zahlreich. Gleichzeitiges Aussprossen zweier Tochterzellen an einem Mutterzellenpol ließ sich öfter feststellen. Seltener jedoch war „Kronenbildung". Mitunter traten auch kürzere myzelartige Sproßverbände mit deutlicher Querwand-

---

[1]) Will, H., a. a. O., S. 99.

bildung auf, meist aus ovalen bis zitronenförmigen Zellen bestehend. Sowohl im Hefenring wie im Bodensatz reagierten die Zellen sehr schwach auf Glykogen.

In Hautkulturen, die in ganz ähnlicher Weise, wie oben, beschrieben, mit Most angelegt wurden, machten sich gleichfalls nach 5 Tagen die ersten Anzeichen einer Ringbildung bemerkbar. Nach einem Monat hatte sich in diesen Kulturen ein schwacher Hefenring entwickelt, während Hautinselchen nicht zustande kamen. Im Hefenring waren die Zellen entweder tot oder in den Ruhezustand eingetreten. Sporenbildung wurde in ihnen nicht beobachtet. Wurstförmige Zellen waren selten. Die Zellen der Bodensatzhefe befanden sich im Hungerzustande, ließen eine oder mehrere sehr große, scharf begrenzte Vakuolen erkennen, die einen solchen Umfang erreicht hatten, daß das Plasma auf eine dünne, der Wand anliegende Schicht zurückgedrängt war. Einzelne Zellen befanden sich im Ruhezustand, und ein großer Teil von ihnen war ganz abgestorben. Wurstförmige Zellen ließen sich auch im Bodensatz nur vereinzelt nachweisen. Sowohl die Zellen des Hefenringes wie die Bodensatzhefen reagierten gar nicht oder nur sehr schwach auf Glykogen.

4. Sporenbildung.

Entstehung, Form und Größe der Sporen. Wesentliche Unterschiede gegenüber dem von Hansen in bezug auf Sporenbildung eingehend untersuchten Saccharomycodes Ludwigii H. scheinen nicht zu bestehen, doch soll hier wegen der Wichtigkeit der Sporenbildung als diognostisches Merkmal für die Unterscheidung der Saccharomyceten auf die einzelnen Beobachtungen näher eingegangen werden.

Die Anlage der Sporen (Fig. 44—46, Taf. I) scheint nach unseren Beobachtungen etwas anders vor sich zu gehen als bei den Saccharomyceten im allgemeinen. Bei letzteren wird die Bildung der Sporenanlagen durch gewisse Veränderungen des Zellinhaltes eingeleitet, die nach Will[1]) im wesentlichen eine gleichmäßigere Verteilung und Vermischung der geformten Einlagerungen im Plasma herbeiführen dürften. Nach dieser Um-

---

[1]) Will, H., a. a. O., S. 54.

bildung des Zellinhaltes, werden die Sporenanlagen selbst in Form rundlicher, noch nicht scharf umgrenzter Plasmaanhäufungen sichtbar. Bei der untersuchten Saccharomycodes-Art verschwinden dagegen die für diese Hefe charakteristischen und besonders in Gipsblockkulturen auftretenden zahlreichen und großen Granula vor der Sporenbildung nicht. Sie ordnen sich vielmehr an bestimmten Stellen mehr oder weniger kreisförmig an, sind aber innerhalb des Kreises noch deutlich einzeln zu erkennen. Bald darauf bildet sich, und zwar anscheinend ziemlich rasch, aus der kreisförmigen Granulaanhäufung eine allseits geschlossene, ziemlich dicke Wandung, die anfangs nicht deutlich hervortritt. Sie umschließt ein oder mehrere große Granula, während der übrige von der eben entstandenen Wandung umgrenzte Zellraum wie ausgeleert erscheint. Auf der Außenseite der Wand lagern sich einzelne Granula an, so daß die jungen Sporenanlagen mehr oder weniger eckig (polygonal) aussehen (Fig. 47, Taf. I). Anfangs bleiben die für die Sporenbildung nicht aufgebrauchten Plasmateile auch zwischen den Sporen noch deutlich sichtbar. Erst allmählich treten Wandung und Sporeninhalt deutlich hervor. Letzterer wird dann gleichmäßig stark lichtbrechend und enthält nur noch einzelne kleinere Granula. Es kommt aber auch vor, daß sich die bei der Bildung der Sporenanlagen eingeschlossenen Granula zu einem größeren rundlichen stark lichtbrechenden Körper vereinigen. Der übrige von einer scharf hervortretenden Wandung umschlossene Innenraum der Spore erscheint dann wie plasmaleer. Vereinzelt sieht man solche rundliche, stark lichtbrechende Körper auch frei und ohne Wandung in der Mutterzelle liegen. Wie Keimversuche lehrten, handelt es sich auch bei diesen Gebilden um eine Art Sporen, bei denen die Bildung einer deutlich abgegrenzten Membran unterblieben ist, oder die Wand nach der Entstehung wieder resorbiert wird. Allerdings muß auch die Möglichkeit zugegeben werden, daß die Membran vorhanden, aber wegen besonderer physikalischer Eigenschaften nicht sichtbar ist.

Die Form der Sporen ist im allgemeinen rundlich. Da, wo zwei Sporen, was sehr häufig vorkommt, sich gegenseitig berühren, sind dieselben mehr oder weniger abgeplattet. Die Anlagerung der Granula an die Sporenwandung in manchmal ziemlich gleichmäßigen Abständen, kann eine polygonale Form der

Sporen vortäuschen (Fig. 47, Taf. I), doch wurden solche Formen zu verschiedenen Malen, besonders wenn sich die Sporen gegenseitig stark drückten, tatsächlich beobachtet.

Die Größe der Sporen schwankt meist zwischen 3,2 und 4,6 μ, Sporen von 4—4,6 μ kommen besonders in Riesenkolonien vor, in welchen die Zellen ja überhaupt größer sind.

Die Zahl der Sporen schwankt zwischen 1 und 8 in einer Zelle. Die Ein-, Zwei- und Drei-Zahl ist wie bei anderen Saccharomyceten vor allem bei den der unteren Grenze zunächst liegenden Temperaturen (8—8,5° C) zu beobachten. Bei 25° C treten fast ausschließlich je 4 Sporen in einer Mutterzelle auf, die dann fast regelmäßig im Kreuzverband (Fig. 22, 49, und 53, Taf. I) angeordnet sind. Diese Lagerung stellte sich in sämtlichen Nährmedien, in welchen Sporenbildung beobachtet wurde, auffallend häufig ein und darf als ein charakteristisches Merkmal dieses Saccharomycodes angesehen werden. Dabei haben die Mutterzellen fast ausschließlich die charakteristische Zitronenform. Seltener wurden je 5, 6, 7 und 8 Sporen in einer Mutterzelle aufgefunden. Möglicherweise hatten sich in solchen Fällen, besonders da, wo 8 Sporen vorhanden waren, je zwei Zellen, die anfänglich durch eine Querwand voneinander getrennt waren, an der Sporenbildung beteiligt.

Was die Häufigkeit der Sporenbildung anbetrifft, so wird der untersuchte Saccharomycodes in dieser Hinsicht wohl kaum von einem der bis jetzt bekannten Saccharomyceten übertroffen. In einigen Fällen hatten in Gipsblockkulturen und auf Möhren mindestens 80% der vorhandenen Zellen Sporen gebildet. Die Plasmareste (Granula), welche neben kaum ausgereiften Sporen, entweder auf deren Wandung oder freiliegend, noch in der Mutterzelle vorhanden sind, verschwinden im Stadium der Hochreife. In Sporenkulturen, die schon mehrere Tage alt sind, werden die Umgrenzungslinien der Sporen nach der Innenseite der Zelle hin, also da, wo sie sich gegenseitig berühren, undeutlich, während nach der Außenseite der Mutterzelle hin die Sporenwandung noch sehr stark hervortritt. In älteren Sporen werden zahlreiche Granula sichtbar. Die Sporen sind in den Mutterzellen zunächst zu je zweien angeordnet, was meist schon bei den Sporenanlagen zu beobachten ist. Sind die Sporen erst kurz ausgereift, so liegen sie, da die Vierzahl bei der Sporenent-

wicklung die Regel bildet, oft meist in zwei Gruppen zu je 2 Sporen frei in der Mutterzelle, ohne deren Wand zu dehnen. Die beiden Sporen einer jeden Gruppe sind durch eine meist deutlich sichtbare leistenförmige Querwand voneinander getrennt. Bei weiter vorschreitender Reife legen sich die beiden Sporengruppen gewöhnlich im Kreuzverband aneinander und füllen dabei die Mutterzelle so weit aus, daß deren Wandung gedehnt wird. Dabei kann die leistenförmige Scheidewand zwischen den beiden Sporen verschwinden, wie überhaupt die Umrisse an den inneren Berührungsstellen der Sporen in einem höheren Reifestadium zwar nicht ganz verschwinden, aber doch undeutlich werden. Doch ist häufig bei einer bestimmten Einstellung der sporenbildenden Mutterzellen unter dem Mikroskop eine deutliche Scheidewandbildung ähnlich wie bei den übrigen Saccharomyceten zu erkennen.

Über die Kardinalpunkte der Sporenbildung wurde folgendes ermittelt:

Bei 34° C keine Sporen
„ 32,8—32,4° C nach 16½—17 Stunden erste Sporenanlagen (Maximum)
„ 32—31,5° C nach 14—15 Stunden erste Sporenanlagen (Optimum)
„ 6½—7½° C nach etwa 12 Tagen erste Sporenanlagen (Minimum)
„ 5—6° C keine Sporen.

Sporenbildung auf verschiedenen Nährböden und in Nährflüssigkeiten: Der untersuchte Saccharomycodes bildet unter verschiedenen Bedingungen Sporen. Nährstoffmangel ist dazu nicht unbedingt erforderlich, wie am besten die Tatsache beweist, daß der Pilz bei Tröpfchenkultur in Most reichlich Sporen erzeugt. Im folgenden sind noch andere Nährmedien angeführt, auf oder in denen bei einer Temperatur von 20—22° C Sporenbildung beobachtet wurde. Bei den benutzten Zuckerlösungen erfolgte die Aussaat in einer dünnen Flüssigkeitsschicht in feuchten Kammern mit Luftzuführung oder auch am Boden von kleinen Erlenmeyerkölbchen. Die Zuckerlösungen wurden mit Hilfe einer mineralischen Grundlösung in derselben Weise hergestellt wie bei den später beschriebenen Assimilationsversuchen.

Schwarzbrot: Nach 8 Tagen Sporen mäßig häufig. Fast ausschließlich in der Vierzahl und im Kreuzverband angeordnet.

Möhren: Nach 8 Tagen Sporen äußerst zahlreich. Fast ausschließlich in der Vierzahl und im Kreuzverband.

Kartoffeln: Nach 8 Tagen Sporen sehr zahlreich, sonst wie vorher.

Mostgelatine: Nach 6½ Wochen in der zentralen Partie der Riesenkolonien mäßig viel Sporen meist in der bekannten Anordnung. In einer 6 Wochen alten Kolonie waren dagegen keine Sporen zu finden.

Würzegelatine: Nach 2 Monaten in der Randpartie und der zentralen Partie der Riesenkolonien reichliche Sporenbildung, meist in der Vierzahl und in gewöhnlicher Anordnung. Die Sporen häufig unregelmäßig geformt.

Würze, ungehopft: Im Hefenring zahlreiche Sporen.

Glukoselösung: Nach 15 Tagen zahlreiche Sporen, die häufig schon in der Nährlösung auskeimen und dann große Vakuolen zeigen.

Fruktoselösung: Nach 15 Tagen mäßig viel Sporen, die meist schon im Auskeimen begriffen sind.

Galaktoselösung: Nach 15 Tagen enthält fast jede Zelle Sporen. Keimungsstadien nicht zu beobachten.

Mannoselösung: Nach 8 Tagen zahlreiche und häufig schon in der Nährflüssigkeit auskeimende Sporen. Bei der Keimung treten große Vakuolen auf.

Saccharoselösung: Nach 15 Tagen mäßig viel Sporen vorhanden, die z. T. schon in Keimung begriffen sind.

Maltoselösung: Nach 15 Tagen sind mäßig viel noch nicht auskeimende Sporen vorhanden.

Laktoselösung: Nach 15 Tagen zeigen sich äußerst zahlreiche Sporen, die zum Teil schon im Auskeimen begriffen sind.

Raffinoselösung: Nach 15 Tagen sind erst wenig noch nicht auskeimende Sporen zu beobachten.

Dextrinlösung: Nach 15 Tagen Sporen zahlreich und häufig schon im Auskeimen begriffen.

Sporenkeimung: Die ersten Keimungserscheinungen traten in mit Most angelegten Tröpfchenkulturen, für die zwei

Tage alte Zellen aus einer Gipsblockkultur verwendet wurden, bei 23,5° C nach 16 Stunden auf. Vor der Keimung quellen die Sporen stark auf und sehen dann häufig wie entleert aus. Dabei kommt es ähnlich wie bei S. cerevisiae zuweilen doch zu deutlicher Querwandbildung, wozu bemerkt werden muß, daß Hansen[1]) „Scheidewandbildungen" bei den Sporangien von Saccharomycodes Ludwigii H. ziemlich selten beobachtete.

Bei dem weiteren Keimungsverlauf sind mehrere Fälle zu unterscheiden. Verhältnismäßig nicht sehr häufig bilden Einzelsporen für sich einen Keimschlauch, der dann die eigentlichen Hefenzellen abspaltet (Fig. 59—61, Taf. I). Zuweilen beginnt dieser Keimungsvorgang bereits, wenn die Wand der Mutterzelle noch deutlich sichtbar und gut erhalten ist (Fig. 43 und 58, Taf. I).

Nahezu die Regel bildet die zweite Form der Auskeimung. Von zwei nebeneinander liegenden Sporen bildet jede eine kleine warzen- oder wurstförmige Ausstülpung, die entweder für sich allein weiter wächst oder mit der anliegenden Vorwölbung der Nachbarsporen verschmilzt, indem sich die Wände an den Berührungsstellen lösen. Diese Vereinigung geht sehr frühzeitig vor sich, sodaß sie fast einer Verschmelzung der Sporen gleichkommt. Ein Teil der die Sporen trennenden Wandungen bleibt nicht selten noch eine Zeitlang erhalten. Der Teil der so entstehenden Keimungsform, der an der Neubildung nicht teilnimmt, hebt sich durch stark hervortretende und etwas dickere Wandungen von dem wachsenden Stück des Zellkörpers ab (Fig. 62, 63, 70 u. 78, Taf. I).

Drittens kommt es vor, daß drei keimende Sporen in dieser Weise verschmelzen (Fig. 75, 76, u. 81, Taf. I). Auch vier Sporen können sich zu einem Promycel verbinden, wie das Hansen[2]) auch bei Saccharomycodes Ludwigii H. beobachtet hat.

Der letzte für S. Ludwiggii H. ebenfalls schon von Hansen[2]) beschriebene Fall der Sporenkeimung besteht darin, daß 2, 3 oder 4 Sporen einer Mutterzelle zu einem einzigen Sporen-

---

1) Hansen, E. Chr., Über die Keimung der Sporen bei den Saccharomyceten. Gesammelte theor. Abhandl. über Gärungsorganismen, Jena 1911, S. 274.

2) a. a. O., S. 279.

körper verschmelzen,noch ehe irgend welche Promycelbildung zu beobachten ist (Fig. 64—68 u. 71, Taf. I). Die Trennungswände an den Berührungsstellen der Sporen lösen sich dabei, ihre Reste bleiben noch eine Zeitlang sichtbar und verschwinden dann völlig. Der so entstandene Sporenkörper, an dem oft nicht mehr deutlich zu erkennen ist, wie viel Sporen sich an seiner Bildung beteiligt haben, bildet in der Regel einen, seltener zwei Keimschläuche (Fig. 64—68 u. 71, Taf. I).

Der Keimschlauch, das sog. Promycel, hat verschiedene Form. Manchmal stellt er nur eine höckerartige Ausstülpung dar, öfter ist er wurst- oder schlauchförmig, und auch ein Anklang an die Zitronenform macht sich an ihm zuweilen bemerkbar. Nicht selten erscheint er auch mycelartig ausgebildet und eigenartig (darmförmig) gewunden (Fig. 39, Taf. I).

Die Wandung der Sporenmutterzelle ist in den meisten Fällen noch in weit vorgeschrittenen Keimstadien zu erkennen. Im weiteren Verlauf der Keimung verschwindet sie, es kommt aber auch vor, daß die Mutterzelle selbst dann noch, wenn bereits Zellenneubildung eingetreten ist, deutlich sichtbar ist. Sie liegt dann, meist in ihrer ursprünglichen Form noch deutlich erkennbar, neben oder auf den keimenden Sporen (Fig. 70 u. 81, Taf. I). Öfter wurde beobachtet, daß die Mutterzelle an einer Stelle, fast immer seitlich, platzte und die Sporen ganz oder teilweise ausstieß (Fig. 51, Taf. I). Die Austrittsstelle der Sporen war dann meistens in Gestalt eines Risses an der daneben liegenden, mehr oder weniger geschrumpften, jedoch nicht deformierten Mutterzellmembran deutlich zu sehen (Fig. 56 u. 57, Taf. I). Auch kann der Fall eintreten, daß nur eine oder ein Teil der Sporen aus der Mutterzelle austritt und dann meist sofort zu keimen beginnt, während noch eine oder mehrere Sporen in der Mutterzelle zurückbleiben, ohne vorerst auszukeimen (Fig. 58, Taf. I). Manchmal konnten wir in unseren Präparaten Sporenhaufen finden, die wahrscheinlich durch eine von aufgelösten Granulationen herrührende Klebmasse zusammengehalten wurden (Fig. 52, Taf. I). In einen Monat alten Hautkulturen war von den in der Regel in der Vierzahl vorhandenen Sporen meist nur eine oder höchstens 2 im Auskeimen begriffen. Die Mutterzellmembran war hier verdickt und trat scharf hervor.

II. Physiologie.

1. Gärversuche.

A. Kleingärmethode.

Die Kleingärmethode wurde nach den von P. Lindner[1]) angegebenen Vorschriften mit 6 Tage altem, bei 20° C auf schräg erstarrter Mostgelatine herangezüchtetem Impfmaterial und folgenden, von E. Merck bezogenen Zuckerarten ausgeführt: Glukose, Fruktose, d-Galaktose, Mannose, Saccharose, Maltose, Laktose, Raffinose und Dextrin. Daneben wurden zur Kontrolle Versuche ohne Zucker (blinde Versuche) angestellt, außerdem natürlich auch die bei keiner Versuchsreihe fehlenden Parallelversuche. Als Grundlösung wurde neutrales Hefenwasser verwendet. Nach dem Impfen wurden die Kulturen bei etwa 20° C gehalten und eine Woche lang täglich beobachtet. Die in der Tabelle angegebenen Zahlen und Zeichen sind folgendermaßen zu erklären:

Das — Zeichen soll anzeigen, daß keine Gärung eingetreten ist,

$+^1$ bedeutet sehr gute Vergärung; nach 24 Stunden fast die ganze Höhlung des Objektträgers mit einer großen Gasblase erfüllt.

$+^2$ = gute Vergärung, d. h. nach 24 Stunden ist etwa die Hälfte der Höhlung mit einer Gasblase erfüllt.

$+^3$ = geringe Vergärung; nach 24 Stunden mehrere ganz kleine Gasblasen vorhanden.

$+^4$ = schlechte Vergärung, d. h. es treten erst innerhalb 4 Tagen Gasblasen auf. Das zweite — oder + zeigt das Ergebnis des Parallelversuches an.

Glukose	Fruktose	d-Galaktose	Mannose	Saccharose	Maltose	Laktose	Raffinose	Dextrin	Blinder Versuch
$+^1,+^1$	$+^1,+^1$	$+^4,+^4$	$+^1,+^1$	$+^1,+^1$	—,—	—,—	$+^{2-3}$, $+^3$	—,—	—,—

Eine Wiederholung der Versuche lieferte dasselbe Ergebnis. Bei Galaktose traten erst nach gelindem Erwärmen Gasblasen auf, dieser Zucker wird also nur in sehr geringem Grade ver-

[1]) Lindner, P., Mikroskopische Betriebskontrolle in den Gärungsgewerben. 5. Aufl. 1909, S. 275.

goren. Maltose, Laktose und Dextrin werden, so weit man nach der Kleingärmethode urteilen kann, überhaupt nicht angegriffen.

B. Gärverlauf in Most und Würze.

Die Versuche wurden in folgender Weise ausgeführt:

Je 200 ccm Most wurden in Gärflaschen von 300 ccm Inhalt eingefüllt, pasteurisiert, einige Tage stehen gelassen und dann mittels steriler Pipette mit 3 Tropfen Bodensatzhefe beimpft. Die Versuchsgefäße fanden dann in einem Brutschrank Aufstellung, dessen Temperatur sich zwischen 20 und 22° C bewegte. Schon die äußeren Gärungserscheinungen ließen erkennen, daß der Gärverlauf ein äußerst träger war. Die bei vielen Weinhefen zu Beginn der Gärung eintretende Trübung der Gärflüssigkeit war nur sehr schwach und verschwand unter Entstehung eines mäßig starken Bodenbelages nach kurzer Zeit. Im weiteren Verlauf der Gärung blieb der Most völlig klar. Die Dauer der Gärung betrug beinahe 8 Wochen. Der Kohlensäureverlust war nur während der ersten Tage von nennenswerter Höhe. Das Maximum wurde am dritten Tage nach Anstellung der Versuche erreicht und betrug 1,2 g innerhalb 24 Stunden. Ungefähr zwei Wochen nach Beginn der Gärung wurde der Kohlensäureverlust mit einer Tagesmenge von etwa 0,2—0,1 g annähernd konstant und ging nur ganz am Schlusse der Gärung noch etwas weiter zurück. Aber selbst diese gegen das Ende der Gärung entstehenden Kohlensäureverluste machten sich infolge der Klarheit der Flüssigkeit noch durch aufsteigende Gasblasen deutlich bemerkbar.

Der Versuchsmost hatte ein Gewicht von 88° Öchsle. Darin wurden bei 4 Parallelversuchen folgende Alkoholmengen gebildet:

Versuch I = 86,7 g im Liter
„ II = 86,3 g „
„ III = 87,7 g „
„ IV = 84,2 g „

Die Bodensätze wurden am Schlusse der Gärung näher untersucht. Sie waren sämtlich sehr gleichmäßig, ziemlich festliegend und verteilten sich beim Schütteln staubig in dem darüber stehenden Jungwein. Fast ausschließlich bestand der Trub aus den charakteristischen zitronenförmigen Zellen, die

zum größten Teil noch lebend waren und sich meistens durch eine ziemlich kleine, undeutlich sichtbare, runde Vakuole auszeichneten, in der sich ein stärker lichtbrechendes, gleichfalls rundliches Körnchen von oft beträchtlicher Größe zu erkennen gab (Fig. 82, Taf. I). Dieser Einschlußkörper hatte nicht selten einen Durchmesser von 3—3,5 μ und füllte dann fast die ganze an und für sich kleine Vakuole aus. Selten waren zwei derartige Gebilde vorhanden, und nur vereinzelt kam es vor, daß sie nicht eine rundliche, sondern mehr eckige Gestalt aufwiesen. Der übrige Zellinhalt der Bodensatzhefe erschien eigentümlich wässerig durchscheinend und nicht granuliert. Neben den lebenden Zellen enthielt der Trub nach Abschluß der Gärung in geringen Mengen auch tote Zellen.

In ungehopfter Würze von 9,6° Ball. erzeugte der Pilz bei 20—22° C in der Zeit von einem Monat 1,0 Maß-Prozent Alkohol.

C. Gärversuche im großen mit Raffinose.

Eine 1prozentige Raffinoselösung in Hefenwasser wurde mit dem Saccharomycodes geimpft und bei 20—22° C aufgestellt. Äußere Gärungserscheinungen traten nicht ein, es fand jedoch kräftiges Wachstum statt. Der Versuch wurde nach 6 Wochen abgeschlossen. Eine jetzt vorgenommene mikroskopische Untersuchung ergab, daß sich in der Lösung eine Vegetation sehr kräftig aussehender, meist zu größeren Sproßverbänden vereinigter Saccharomycodes-Zellen entwickelt hatte. Bei der chemischen Untersuchung fand sich in der Lösung noch ein unvergorener, direkt reduzierender Zuckerrest von 0,1596 g in 100 ccm. Zu dem Versuch ist allerdings zu bemerken, daß die Raffinoselösung in strömendem Wasserdampf sterilisiert wurde. Es hätte also Hydrolyse des Zuckers eintreten können.

2. Grenztemperaturen für die Vermehrung.

Es wurde nur die obere Wachstumsgrenze festgelegt, wobei Most als Versuchsflüssigkeit zur Anwendung kam. Die von E. Ch. Hansen[1]) angegebenen Bedingungen wurden ziemlich genau eingehalten, indem wir mittels steriler Pipette zunächst 2

[1]) Hansen, E. Chr., Compt. rend. Carlsberg Labor. T. 7. 1908; vergl. auch Will, H., Centralbl. f. Bakt. II. Abt. *44*, 1916, S. 273.

Tropfen Bodensatzhefe in 10 ccm der Versuchsflüssigkeit übertrugen. Von der so hergestellten Verdünnung vermischten wir wieder 2 Tröpfchen mit 10 ccm sterilem Most. Diese zweite Verdünnung wurde für die Festlegung der Wachstumsgrenze benutzt, indem sie in Mengen von 10 ccm in Freudenreichkölbchen bei verschiedenen Temperaturen aufgestellt und eine Woche lang beobachtet wurde. Nach Ablauf dieser Zeit wurde folgendes festgestellt:

Bei 35—36° C noch deutliches Wachstum
„ 37° C gerade noch Sproßung (Grenze)
„ 38—39° C alle Zellen tot.

Um zu prüfen, ob die Zellen sämtlich abgestorben waren, wurden die Kulturen, die bei 38—39° C gestanden hatten, noch eine Woche lang bei 22° C gehalten. Es fand jedoch auch bei dieser Temperatur kein Wachstum mehr statt.

3. Widerstandsfähigkeit gegen Erhitzen.

Um die Widerstandsfähigkeit der Saccharomycodes-Hefe gegen Erhitzen festzustellen, wurden mittels steriler Pipette drei Tropfen Bodensatzhefe in Reagenzgläser übertragen, die 10 ccm sterilen Most enthielten. Die Röhrchen wurden dann in einem Wasserbad langsam angewärmt, wobei die Wärmezufuhr so geregelt wurde, daß sich der Most in einem mit Thermometer versehenen Kontrollröhrchen innerhalb von 10 Minuten von Zimmertemperatur auf 50° C erhitzte. War der gewünschte Wärmegrad erreicht, dann wurde die Flamme so eingestellt, daß sich die Temperatur 30 Minuten konstant erhielt. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Röhrchen aus dem Wasserbad herausgenommen und zu weiterer Beobachtung in einen Brutschrank von 22° C gebracht. Die angewendeten Temperaturen lagen zwischen 50—60° C.

Wie der Versuch ergab, waren nach Einwirkung einer Temperatur von 53,5° C noch so viel Zellen leben geblieben, daß nach 4 Tagen Wachstum deutlich bemerkbar wurde. Dagegen genügte unter den gewählten Bedingungen die Erhitzung auf 54° C, um jede Entwicklung des Pilzes zu verhindern.

4. Widerstandsfähigkeit gegen Äthylalkohol.

Zur Ermittlung derjenigen Mengen Alkohol, welche die Entwicklung des untersuchten Saccharomycodes hemmen, wurden sterile Alkohol-Mostmischungen hergestellt, die in 100 ccm enthielten :

4,47 g	Alkohol	=	5,63	Maß-Proz.	Alkohol
7,19 g	„	=	9,06	„	„
9,70 g	„	=	12,23	„	„
12,11 g	„	=	15,26	„	„

Die Lösungen wurden in Mengen von je 50 ccm in Erlenmeyerkölbchen verteilt, mit je 3 Tropfen Bodensatzhefe beimpft und nach Anbringung kleiner Gärverschlüsse bei einer Temperatur von 20° C zur Beobachtung aufgestellt. Nach 3 Tagen machten sich in der Mischung I, die 5,63 Maß-Proz. Alkohol enthielt, Wachstums- und Gärungserscheinungen bemerkbar. Nach weiteren 4 Tagen wurde dasselbe in Mischung II beobachtet, die 9,06 Maß-Proz. Alkohol aufwies. In den Mischungen III und IV mit 12,23 und 15,26 Maß-Proz. Alkohol blieb jede Entwicklung aus. Die Zellen waren in den beiden Mosten sogar abgestorben, denn es trat auch kein Wachstum ein, nachdem der alkoholhaltige Most abgegossen und durch Most ohne Alkohol ersetzt wurde. Die Entwicklungsgrenze dürfte nach diesen Versuchen jedenfalls näher bei 9,06 Maß-Proz. als bei 12,23 Maß-Proz. zu suchen sein. Als Grenze, bei der die Abtötung der Einsaat unter den gegebenen Verhältnissen erfolgt, kann eine Alkoholkonzentration von etwa 12 Maß-Proz. angenommen werden.

5. Widerstandsfähigkeit gegen schweflige Säure.

Um die Widerstandsfähigkeit der Saccharomycodes-Art gegen schweflige Säure zu ermitteln, wurden mit Hilfe einer Lösung von Kaliummetasulfit 4 Versuchsmoste hergestellt, von denen enthielten :

Geschwefelter steriler Most	I	—	296	mg	SO_2	im	Liter
„ „ „	II	—	387,4	„	„	„	„
„ „ „	III	—	473,6	„	„	„	„
„ „ „	IV	—	560,4	„	„	„	„

Diese Moste wurden in Mengen von je 50 ccm mit je drei Tropfen Bodensatzhefe aus steriler Pipette beimpft und dann bei 20° C zur Beobachtung aufgestellt.

In Most I mit 0,296 ‰ schwefliger Säure zeigten sich schon nach drei Tagen deutlich Wachstums- und Gärungserscheinungen. In Most II mit 0,387 ‰ schwefliger Säure erschienen nach neun Tagen am Boden der Kulturgefäße vereinzelt rundliche, grauweiße, scharf umgrenzte Hefenkolonien, deren Durchmesser bis zu 4 mm groß war. Sie nahmen bald an Umfang zu und vereinigten sich so schnell miteinander, daß der Boden der Versuchskölbchen schon nach zwei weiteren Tagen von einem gleichmäßigen Hefenbelag überzogen war. Nach 12 Tagen zeigte sich in einem der mit Most III beschickten Kölbchen dieselbe Erscheinung. Es war also hier noch bei Anwesenheit von 473,6 mg schwefliger Säure im l Hefenwachstum eingetreten. In einem zweiten, mit demselben Most gefüllten Versuchsgefäß trat dagegen keine Entwicklung ein, obwohl die betreffende Kultur mehrere Wochen lang unter Beobachtung gehalten wurde. Auch nachdem der sulfithaltige Most abgegossen und durch reinen Most ersetzt worden war, blieb die Vermehrung der eingesäten Hefen aus. Jedenfalls waren also sämtliche Zellen unter der Einwirkung des Sulfits abgestorben. Dasselbe Ergebnis hatten die Versuche mit Most IV, der 560 mg SO_2 im l enthielt. Gärung und Wachstum traten nicht ein, sondern die eingeimpften Hefen wurden abgetötet. Die Entwicklungsgrenze lag also bei einem Gehalt von 473,6 mg SO_2 im l. Wie bei den Ergebnissen der Ausgangsversuche vorauszusehen war, erwies sich die Saccharomycodes-Hefe als sehr widerstandsfähig gegen Sulfite.

6. Assimilationsversuche mit Zuckerarten.

Zu den Assimilationsversuchen wurde eine mit Leitungswasser hergestellte Nährlösung benutzt, die in 100 ccm enthielt: 0,025 g $MgSO_4$, 0,5 g KH_2PO_4 und 0,5 g $(NH_4)_2SO_4$ Hierzu wurden je 5 % des zu prüfenden Zuckers zugesetzt. Von den so erhaltenen Nährlösungen wurden die monosehaltigen im strömenden Dampf, die polyosehaltigen zur Verhütung einer möglicherweise eintretenden Hydrolyse mit Chloroform sterilisiert, indem je 100 ccm der betreffenden Lösungen mit Chloroform gesättigt und möglichst oft und stark umgeschüttelt wurden. Nach mehreren Tagen wurden die so behandelten, vom Chloroform abgegossenen Nährflüssigkeiten in Mengen von je 5 ccm

auf Freudenreichkölbchen verteilt und noch eine Woche bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Erwiesen sie sich nach dieser Zeit als keimfrei, dann wurden sie mit der Hefe beimpft. Das Impfmaterial wurde bei 20° C auf schräg erstarrter Würzegelatine herangezüchtet. Nach 6 Tagen wurde so viel davon in die Nährflüssigkeit eingetragen, daß diese ganz schwach getrübt wurde. Die Kulturen blieben dann bei Zimmertemperatur (etwa 20° C) 14 Tage stehen, worauf durch Schütteln der Kölbchen die entstandene Trübung feltgestellt wurde. Sie galt als Maßstab für das Hefenwachstum und die Intensität der Assimilation. Nach Abschluß des Versuchs wurden die in den einzelnen Nährlösungen gebildeten Hefenvegetationen auch mikroskopisch untersucht und die dabei festgestellten Tatsachen bei der Beurteilung des Assimilationswertes der einzelnen Zuckerarten mitberücksichtigt. Die Ergebnisse dieser verschiedenen Beobachtungen sind in der nachstehenden Tafel, die auch über die verwendeten Zuckerarten Aufschluß gibt, zusammengefaßt. Die darin enthaltenen Zahlen und Zeichen haben folgende Bedeutung:

3 = starke Trübung und kräftige Assimilation.
2 = mäßig starke Trübung und mäßig starke Assimilation.
1 = schwache Trübung und sehr schwache Assimilation.
± = Trübung sehr schwach, Assimilation auch nach dem mikroskopischen Befund sehr unsicher.

Zu den Angaben der Tabelle ist noch zu bemerken, daß zum Vergleich auch Kulturen mit der Grundlösung allein angelegt wurden. Während der Beobachtungszeit war darin Wachstum der eingesäten Hefen kaum festzustellen.

Glukose	Fruktose	d Galaktose	Mannose	Saccharose	Maltose	Laktose	Raffinose	Dextrin
±	±	±	±	1–2	1–2	3	3	2

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß die Monosen kaum, die Polyosen, besonders Laktose und Raffinose, dagegen sichtlich assimiliert werden.

Die mikroskopische Untersuchung der entstandenen Hefevegetationen führte zu folgenden Ergebnissen:

Assimilationsversuch mit Glukose (Dextrose): Wachstum hat stattgefunden, vielleicht aber auf

Kosten der im Aussaatmaterial vorhandenen Nährstoffe. Die Zellen sind zu größeren Verbänden vereinigt und mit auffallend großen Vakuolen versehen. Das Plasma ist auf einen schmalen, von der Vakuole deutlich abgegrenzten Wandbelag zurückgedrängt, von dem aus nicht selten Plasma-Stränge quer durch die Zelle ziehen. Es handelt sich um die bekannte Erscheinung, die sich vor der Verschmelzung mehrerer Vakuolen zu einer einzigen einstellt und darauf beruht, daß sich die Vakuolenhäute mehr und mehr einander nähern und so das Aussehen von Strängen annehmen, welche eine größere Vakuole scheinbar durchsetzen. Ein großer Teil der Zellen hat Sporen gebildet, die häufig schon im Auskeimen begriffen sind. Glykogenreaktion tritt in den Zellen nicht ein.

Assimilationsversuch mit Fruktose (Lävulose): Wachstum sehr schwach. Sonst ähnliche Verhältnisse wie in der Glukoselösung.

Assimilationsversuch mit Galaktose: Wachstum schwach, vielleicht auf Kosten der im Aussaatmaterial vorhandenen Nährstoffe erfolgt. Zellverbände häufig. Form und Inhalt der Zellen ähnlich wie in der Glukoselösung.

Assimilationsversuch mit Saccharose: Zahlreiche neugebildete Zellen und größere Zellverbände. Assimilation hat ohne Zweifel stattgefunden. Zellen sind kräftiger ernährt als in den Monoselösungen. Sporen mäßig häufig, teilweise in Keimung begriffen. Die Zellen geben zum Teil sehr deutliche Glykogenreaktion.

Assimilationsversuch mit Maltose: Die Vegetation zeigt ein ähnliches Bild, wie in den Saccharoselösungen. Die Zellen scheinen jedoch weniger kräftig ernährt zu sein. Sporen sind vorhanden, aber noch nicht in Keimung begriffen. Vereinzelt deutliche Glykogenreaktion.

Assimilationsversuch mit Laktose: In der Lösung hat kräftiges Wachstum der eingesäten Hefen stattgefunden. Es sind zahlreiche fest zusammenhaltende, ziemlich große (flockige) Zellverbände entstanden, die aus gut ernährten Zellen bestehen. Sporen sind in großer Menge vorhanden und zum Teil schon im Auskeimen begriffen. Die meisten Zellen geben schwache Glykogenreaktion.

Assimilationsversuch mit Raffinose: Der Befund ist ganz ähnlich wie in den Laktoselösungen. Sporenbildung ist jedoch nicht so reichlich erfolgt. Die Zellen sind meist sehr reich an Glykogen.

Assimilationsversuch mit Dextrin: Es hat ziemlich starkes Wachstum stattgefunden, die neugebildeten Zellen scheinen jedoch nicht so gut ernährt zu sein. Sporen sind in großer Zahl gebildet und in der Keimung schon weit vorgeschritten. Einzelne Zellen sind deutlich glykogenhaltig.

7. Glykogenbildung.

Wie die vorstehend beschriebenen Untersuchungen ergeben haben, ist die Saccharomycodes-Hefe zu reichlicher Glykogenspeicherung befähigt. Der Glykogennachweis wurde bei unseren Beobachtungen mit der von Will[1]) angegebenen Jodlösung geführt.

8. Verflüssigungskraft.

In Stichkulturen, die bei 20—22° C gehalten wurden, trat nach 7 Wochen leichte Verflüssigung der Gelatine ein.

III. Vergleich mit Saccharomycodes Ludwigii Hansen.

Es war nun die Frage zu entscheiden, ob die von uns aufgefundene Saccharomycodes-Hefe als eine neue Art oder als eine Rasse einer bereits bekannten Species anzusprechen war. Nach den von uns festgestellten Merkmalen konnte eine Varietät von Saccharomycodes Ludwigii Hansen vorliegen. Um darüber Klarheit zu gewinnen, wurden Vergleichskulturen von dieser Hefe angelegt und näher untersucht. Wir gingen dabei von einer Kultur aus, die uns Herr Prof. Dr. Will-München in dankenswerter Weise zur Verfügung stellte. Die Ergebnisse dieser Beobachtungen sind im folgenden in einer vergleichenden Übersicht zusammengestellt. Es mag vorausgeschickt werden, daß die beiden Formen in manchen Eigenschaften zwar verschieden sind, in anderen aber so weit übereinstimmen, daß wir die im Wein vorkommende Form wenigstens vorläufig nur als eine Varietät von Saccharomycodes Ludwigii Hansen ansehen können. Wir werden sie als Saccharomycodes Ludwigii var. vini Kr. e. H. bezeichnen.

[1]) a. a. O., S. 440.

Gegenüberstellung.

	Saccharomycodes Ludwigii H.	Saccharomycodes Ludwigii var. vini.
Vegetationsform in drei Tage alten Mostkulturen	Der Organismus tritt hauptsächlich in zwei Zellformen auf. Erstens sind in beträchtlicher Zahl kleinere ovale, zitronenhantel- oder schuhsohlenähnliche Zellen vorhanden, die etwa 7,3—13,1 μ lang und 2,9 bis 5,2 μ breit sind. Die Ausmessungen schwanken je nach dem Zustand der Sprossung. Typische zitronenförmige Zellen besitzen häufig eine Größe von 13,1 : 5,2 μ. Zweitens kommen verhältnismäßig häufig größere langgestreckt zitronenförmige oder wurstartige Zellen vor, die meist schon mehr oder weniger große Sprosse gebildet und mit diesen zusammen vielfach eine Länge von 19—20 μ und eine Breite von 5—5,4 μ erreicht haben. Endlich finden sich ausgesprochene Riesenzellen vor, die meist wurstartige Gestalt besitzen und durch große Vakuolen auffallen. Ihre Länge beträgt mindestens 25 μ.	Vorherrschend zitronenähnliche Zellen, daneben Sprosse von Birnform und Übergänge von der Birnform zur Zitronenform. Wurstförmige Zellen äußerst selten. Die Größenmaße betragen bei jungen Sprossen 7,4 : 6,3 μ, bei Zellen in mittleren Sprossungstadien 9,3 : 4 μ und bei typischen zitronenförmigen Zellen 18,6 : 6,1 μ.
Vegetationsform in sechs Tage alten Mostkulturen	Der Trub besteht vorwiegend aus wurstförmigen Zellen. Daneben kommen Riesenzellen mit sehr großen Vakuolen und typisch zitronenförmigen Zellen vor, die aber kleiner sind als bei der im Wein vorkommenden Varietät. Der Trub (Bodensatzhefe) ist dunkler gefärbt und neigt mehr zur Flockenbildung als bei S. Ludw. v. vini.	Ähnliche Zellformen wie in den jüngeren Kulturen. Ausgesprochen wurstförmige Zellen sind selten. An den vorhandenen langgestreckten Zellen macht sich deutlich die Neigung zur Beibehaltung der Zitronenform bemerkbar. Trub heller als bei S. Ludwigii, gleichmäßig und ziemlich festliegend.
Wachstumserscheinung. in Tröpfchenkult. mit Most	Es entwickeln sich ziemlich stark in die Tiefe wachsende Kolonien, in denen vereinzelt Riesenzellen auftreten.	Die Kolonien besitzen breite Basis u. konische Form, wachsen jedoch wenig in die Tiefe u. führen keine Riesenzellen.
Wachstumserscheinungen bei Einzellkultur i. Mostgelatine	Rundliche Kolonien, die fast ausschließlich aus mehr oder weniger langgestreckten Zellen bestehen und von einem losen Kranz wurstförmiger Zellen umgeben sind.	Kolonien meist regelmäßig wie Typus I (Maulbeerform) oder unregelmäßig mit regelmäßigem Kern wie Typus II nach Will (a. a. O. S. 83). Wurstförmige Zellen fehlen ganz oder sind nur in äußerst gering. Zahl vertreten.

Gegenüberstellung.

	Saccharomycodes Ludwigii H.	Saccharomycodes Ludwigii var. vini.
Riesenkolon. auf 10%iger Mostgelatine (6 Versuche) 20—22° C.	Nach 6½ Wochen Kolonien von 13 mm Durchmesser. Mittlerer Teil höckerförmig. Randschichten wie bei S. Ludw. v. vini flach ausgebreitet. Strombildung weniger deutlich als bei der im Wein auftretenden Varietät, dagegen zahlreiche radial verlaufende Streifen. Oberfläche der Kolonien in keinem Falle gesprenkelt; auch einzelne Tupfen fehlen. Farbe im mittleren Teile weißlichgrau, am Rande mattgrau. Die Kolonien gehören zum Typus Ia nach Will[1]).	Nach 6½ Wochen Kolonien von 10—12 mm Durchmesser. Zentrale Partie höckerförmig erhaben, im übrigen flach ausgebreitet. Oberfläche der Kolonien hauptsächlich in der Randpartie weiß gesprenkelt. Weiße Tupfen nicht immer zahlreich, manchmal sogar ganz vereinzelt, aber immer vorhanden, äußerster Rand nicht gesprenkelt. Anhänge kaum sichtbar. Strombildung bemerkbar, aber nicht immer besonders deutlich ausgeprägt. Ströme fächerförmig, einzelne Sektoren in der Randpartie schärfer hervortretend. Farbe der zentralen Partie weiß, die der Randpartie grau. Kolonien vom Typus Ia nach Will[1]).
	Das Zellenmaterial ist ähnlich beschaffen wie in den Riesenkolonien von S. Ludw. v. vini, doch sind die wurstförmigen Zellen häufiger und länger, die Größenunterschiede zwischen den einzelnen Zellen, wenigstens in den Randpartien, auch auffallender. In der zentralen Partie sind die Zellen meist ebenso groß, in der Randpartie im allgemeinen größer als in Flüßigkeitskulturen. Sporen nicht zu beobachten. Die Randpartie enthält viel langgestreckt wurstförmige Zellen von so beträchtlichen Ausmessungen, wie sie bei S. Ludw. v. vini unter den gleichen Verhältnissen nicht auftreten. Im mittleren Teil der Kolonie vereinzelt Riesenzellen und mycelähnliche Sproßverbände. Glykogenreaktion in der Randpartie schwach bis deutlich, in den zentralen Stellen nur schwach oder negativ. Die Anhänge besitzen ähnliches Zellenmaterial wie die Randpartie, doch sind wurstförmige Zellen hier noch häufiger, wenn auch seltener mycelartig verbunden. Glykogenreaktion in den Anhängen sehr häufig.	In der zentralen Partie neben Zellen der gewöhnlichen charakteristisch. Form viele von abnormer Gestalt sowie einige langgestreckt wurstförmige Zellen. Vereinzelt unförmige, meist tote Riesenzellen, vielleicht durch Verschmelzung mehrerer in Auflösung begriffener Zellen entstanden. Die Zellen der zentralen Partie enthalten oft Sporen, aber selten und nur in gering. Mengen Glykogen. In den Randpartien besser ernährte Zellen, deren Form vielfach eine Übergangsstufe von der Zitronen- zur Wurstform darstellt. „Kronenbildung“ nicht selten. Glykogenreaktion schwach bis deutlich. Sporenbildung ist in den Randpartien nicht zu beobachten, dagegen kommen hier auffallend lange wurstförmige Zellen vor, die oft eine Größe von 30 : 8 μ aufweisen.

[1]) Will, H., Anleitung usw. S. 108, Taf. I.

Gegenüberstellung.

	Saccharomycodes Ludwigii H.	Saccharomycodes Ludwigii var. vini.
Stichkultur i. Mostgelatine	Nach 10 Wochen Kolonien konisch in die Tiefe (2—3 cm) gewachsen. Zellenmaterial ähnlich beschaffen wie in den Stichkulturen von S. Ludwigii v. vini. Zellen aus den tiefsten Stellen des Stichkanals geben deutliche Glykogenreaktion, die des Oberflächenbelages sind glykogenfrei.	Stichkanal in einer 5 cm hohen Gelatineschicht bis zu einem Drittel seiner Länge bewachsen. Nach einem Monat reichen die Kolonien fast bis auf den Grund der Reagenzgläser. Zellen größer als in Flüssigkeitskulturen, nicht selten wurstförmig und 25,4 : 6,3 μ groß, zum Teil auch noch größer.
Hautbildung in Most	Nach 10 Wochen von Hautbildung noch keine Anzeichen, von einem Hefenring nur Spuren bemerkbar. Der Bodensatz ist sehr locker und von zahlreichen Hefenklümpchen bedeckt. Zellen im eigentlichen Bodensatz fast ausschließlich ruhend oder abgestorben, nicht sporenhaltig.	Nach 5 Tagen Anzeichen v. Ringbildung. Nach einem Monat schwacher Hefenring, aber keine Hautinselchen. Zellen im Hefenring tot oder im Ruhezustand ohne Sproßbildung. Zellen der Bodensatzhefe im Ruhezustand oder abgestorben. Wurstförmige Zellen im Hefenring wie im Bodensatz selten. Glykogen in den Zellen beider Vegetationen nicht oder nur in geringen Spuren nachzuweisen.
Sporenbildung	Wesentliche Unterschiede in der Art der Sporenbildung bestehen zwischen den beiden Formen anscheinend nicht. Sporengröße 3—4 μ.	Wesentliche Unterschiede in der Art der Sporenbildung bestehen zwischen den beiden Formen anscheinend nicht. Sporengröße 3,2 : 4,6 μ.

Gegenüberstellung.

	Saccharomycodes Ludwigii H.	Saccharomycodes Ludwigii var. vini.
Widerstandsfähigkeit gegen schweflige Säure	Bei einem Gärversuch, der nach den Angaben auf S. 281 mit Konzentrationen von 332, 407,6, 480,0 u. 550 mg SO_2 im Liter Most durchgeführt wurde, ergab sich, daß die Entwicklungsgrenze zwischen den Sättigungsgraden von 0,332 und 0,407,6 ‰ SO_2 liegt. Bei Anwesenheit von 332 mg SO_2 im l Most trat nach 10 Tagen noch Wachstum ein, indem sich am Boden der Versuchsgefäße zunächst einzelne, dann zahlreicher auftretende kleine Kolonien bildeten, die sich stetig vergrößerten, dabei hautartige Beschaffenheit annahmen und sich schließlich miteinander zu einem gleichmäßigen Bodenbelag vereinigten. Die Kulturen enthielten neben den typischen zitronenähnlichen Zellen reichlich wurstförmige Zellen. Die Neigung zur Bildung solcher Zellen trat auch hier stärker in Erscheinung als bei S. Ludw. v. vini. In allen Mosten, die 407,6 mg oder mehr schweflige Säure im l enthielten, unterblieb jedes Wachstum. S. Ludwigii H. ist nach dem Ergebnis dieses Versuches gegen schweflige Säure empfindlicher als S. Ludwigii var. vini, wird durch diese Verbindung aber doch weniger beeinträchtigt als die meisten Saccharomycodes-Hefen.	Der auf S. 281 beschriebene Versuch ergab, daß das Wachstum der Hefe im Most durch Mengen von 0,296 ‰ SO_2 im Liter nicht wesentlich behind. wurde. Stärkere Entwicklungshemmungen zeigt. sich erst bei höheren Konzentrationen. Äußerlich sichtbare Wachstumerscheinungen machten sich bei Anwesenheit von 0,387 ‰ SO_2 nicht vor dem neunten Tage, bei Anwesenheit von 0,473 ‰ nicht vor dem zwölften Tage bemerkbar. Eine Steigerung des Gehaltes an schwefliger Säure auf 0,560 ‰ unterdrückte jede Vermehrung und führte zum Absterben der Hefe. Die Entwicklungsgrenze bildet ein Gehalt von 473 mg SO_2 im Liter. S. Ludw. v. vini ist daher gegen schweflige Säure noch erheblich widerstandsfähig. als S. Ludwigii H.
Widerstandsfähigkeit gegen Äthylalkohol	Bei einem Versuch, der nach den Angaben auf S. 281 mit sterilen Alkohol-Mostmischungen durchgeführt wurde, die in 100 ccm enthielten 4,47 g = 5,63 Maß-Proz. Alkohol 7,19 g = 9,06 „ „ „ 9,13 g = 11,50 „ „ „ 12,19 g = 15,36 „ „ „ trat Hefenwachstum ein bei einem Alkoholgehalt von 5,63 Maß-Proz. nach 4 Tagen von 9,06 Maß-Proz. nach 14 Tagen, während die höheren Konzentrationen jedes Wachstum der eingesäten Hefe unterdrückten.	Ein Versuch, der nach den Angaben auf S. 281 mit Alkohol-Mostmischungen durchgeführt wurde, die in 100 ccm enthielten 4,47 g = 5,63 Maß-Proz. Alkohol 7,19 g = 9,06 „ „ „ 9,70 g = 12,23 „ „ „ 12,11 g = 15,26 „ „ „ trat Hefenwachstum (u. Gärung) ein bei einem Alkoholgehalt von 5,63 Maß-Proz. nach 3 Tagen von 9,06 Maß-Proz. nach 7 Tagen. In den Mosten mit höherem Alkoholgehalt vermochten sich die eingesäten Hefen nicht zu entwickeln. S. Ludw. v. vini scheint gegen Alkohol etwas weniger empfindlich zu sein als S. Ludwigii H.

Wie aus diesen Gegenüberstellungen zu ersehen ist, besitzt die von uns aufgefundene Saccharomycodes-Hefe ähnliche Merkmale wie Saccharomycodes Ludwigii H. Ganz stimmt sie mit dieser Art in ihren Eigenschaften aber nicht überein. Soweit die typischen zitronenförmigen Elemente in Frage kommen, ist sie großzelliger als S. Ludwigii H. Während diese Formen bei der letztgenannten Art in der Regel eine Größe von 13,1 : 5,2 μ besitzen, sind sie bei S. Ludw. var. vini Kr. e. H. — wenigstens bei Mostkulturen — meist 18,6 μ lang und 6,1 μ breit. Abweichungen bestehen ferner in der Gestalt und Häufigkeit der wurstförmigen Zellen, die bei S. Ludwigii H. sehr viel zahlreicher und auch etwas anders geformt sind als bei S. Ludw. var. vini. Auch die Wachstumserscheinungen auf festen und in flüssigen Nährböden sind bei den beiden Pilzen nicht ganz dieselben. Ebenso weichen sie in der Fähigkeit zur Bildung eines Hefenringes in geringem Maße voneinander ab. Die Sporen sind bei S. Ludw. var. vini etwas größer als bei S. Ludwigii H. Dagegen verläuft die Sporenkeimung bei beiden Pilzen in gleicher Weise. Gegen Alkohol und schweflige Säure ist S. Ludw. var. vini widerstandsfähiger als S. Ludwigii H., doch ist der Abstand zwischen den beiden Organismen in dieser Beziehung nicht sehr groß.

Im ganzen sind die Merkmalsunterschiede aber doch nicht tiefgehend genug, um die Aufstellung einer neuen Art zu rechtfertigen. Die beiden Organismen sind miteinander nahe verwandt, und man darf die von uns näher untersuchte Saccharomycodes-Hefe daher mit ziemlicher Bestimmtheit als eine Varietät von S. Ludwigii H. ansehen.

IV. Zusammenfassung.

Der untersuchte Saccharomycodes ist nach den bisher angestellten Vergleichen sehr nahe verwandt mit Saccharomycodes Ludwigii H. und kann nur als eine Varietät dieses Pilzes, nicht aber als eine neue Art angesehen werden. Wir bezeichnen den Organismus als Saccharomycodes Ludwigii var. vini Kr. e. H. Nach unseren Untersuchungen besitzt er folgende Merkmale:

In jungen Mostkulturen bildet Saccharomycodes Ludwigii var. vini meist zitronenähnliche Zellen, zeigt darin aber neben frisch abgestoßenen Sprossen von Birnform in der Gestalt seiner Zellen Übergänge von der Birnform zur Zitronenform. Wurstför-

mige Zellen finden sich äußerst selten. Die Abstoßung der jungen Sprosse erfolgt häufig unter deutlicher Querwandbildung. Die Zellgröße ist je nach dem Stadium der Sprossung verschieden. Die Größenmaße betragen bei jungen Sprossen 7,4 : 6,3 μ, bei Zellen in mittleren Sprossungsstadien 9,3 : 4,0 μ und bei typischen, zitronenförmigen Zellen 18,6 : 6,1 μ. Für den Zellinhalt sind zahlreiche große Granula charakteristisch, die besonders in Riesenkolonien und Gipsblockkulturen hervortreten. Die Sprossung geht in Tröpfchenkulturen meist von den Polen aus, seltener tritt sie seitlich auf. Das letztere ist dagegen häufig in Riesenkolonien, wo sogar „Kronenbildung" vorkommt. Die Kolonien in den Tröpfchenkulturen besitzen breite Basis und konische Form, wachsen jedoch weniger in die Tiefe und führen keine Riesenzellen. In den Zuchten auf festen Nährböden werden die Zellen im allgemeinen bedeutend größer als in Flüssigkeitskulturen, jedoch finden sich, wenn auch in geringerer Zahl, auf festen Nährböden auch Zellen von normaler Größe. Im mittleren Teil der auf Mostgelatine erwachsenen Riesenkolonien treten gewöhnlich unförmige Riesenzellen auf, die nicht selten rundliche Form besitzen und dann einen Durchmesser von 18 μ und darüber erlangen. In acht Wochen alten Bodensätzen aus Mostzuchten zeigen die Zellen kleine, rundliche Vakuolen und einen sehr großen rundlichen, jedenfalls fetthaltigen Inhaltskörper.

Die Fähigkeit zur Sporenbildung ist sehr stark ausgeprägt. Die Sporen sind rundlich, erscheinen manchmal aber auch polygonal und erreichen einen Durchmesser von 3,2—4,6 μ. In unreifem Zustande schließen sie ein oder auch mehrere verhältnismäßig große, stark lichtbrechende Körnchen ein. Der Plasmainhalt der reifen Sporen zeigt gleichmäßige Beschaffenheit. Solange die Sporen unreif sind, finden sich in den Sporangien außerhalb der Sporen Granula, die entweder frei liegen oder den Sporenwandungen anhaften. Mit zunehmendem Alter der Sporangien verschwinden diese Granula. Die Sporenbildung wird in den Sporangien eingeleitet durch kreisförmige Anordnung der typischen Granula, die schließlich miteinander verschmelzen und in dem dadurch entstandenen Zellraum anfangs die oben erwähnten vermutlich fetthaltigen Körnchen einschließen. Die einzelnen Sporangien enthalten meistens 4,

seltener 1—3, ganz selten 5— 8 Sporen. Im ersterwähnten Falle sind die Sporen meist im Kreuzverband angeordnet.

Der Pilz zeigt keine Hautbildung und nur mäßig starke Ringbildung. Bei Anzucht in Mostgelatine in der feuchten Kammer wachsen die Kolonien meist nach Typus I (Maulbeerform). Die Riesenkolonien gehören zum Typus Ia. Oberflächenkulturen auf Mostgelatine haben käsiges Aussehen, die Stichkulturen wachsen mäßig in die Tiefe. Der Pilz vergärt Glukose, Fruktose, Galaktose, Mannose, Saccharose und Raffinose, nicht dagegen Maltose, Laktose und Dextrin. Assimiliert werden Saccharose, Maltose, Laktose, Raffinose und Dextrin, nicht dagegen oder kaum Monosen. Der Gärverlauf in Most ist äußerst träge und dauert bei 20—22° C bis gegen 8 Wochen. Nach dieser Zeit sind im besten Fall 8,77 Maß-Prozent Alkohol gebildet. In Würze von 9,6° Ball. erzeugt der Pilz im Verlauf von einem Monat bei 20—22° C etwa ein Maß-Prozent Alkohol. Die Gärung spielt sich meist, von der Bodensatzhefe ausgehend, bei ganz klarer Flüssigkeit ab. Die obere Wachstumsgrenze des Pilzes liegt bei 37° C. Die untere Wachstumsgrenze wurde nicht bestimmt. Die Zellen sind nach ½-stündigem Erhitzen auf 53,5° C noch entwicklungsfähig. Bei Erwärmung auf 54° C sterben sämtliche Zellen nach kurzer Zeit ab. S. Ludwigii var. vini gärt in Most noch bei Anwesenheit von 9 Maß-Prozent Alkohol, stirbt aber bei Steigerung des Alkoholgehaltes auf 12 Maß-Prozent bald ab. Die Glykogenbildung ist sehr stark ausgeprägt, die Verflüssigungskraft mäßig. Der Pilz kann im Most bis zu 470 mg schweflige Säure im l vertragen, ohne in seinem Wachstum dauernd gehemmt zu werden.

Erklärung der Tafel I.

Saccharomycodes Ludwigii var. vini Kr. e. H.

Fig. 1. Zellformen aus einer 3 Tage alten Mostkultur (22—24° C).
Fig. 2a. Sprossende Zelle aus einer Tröpfchenkultur in Most.
Fig. 2b. Entwicklungszustand derselben Kultur nach 2 Stunden (25° C).
Fig. 3a Zellgruppe aus einer Tröpfchenkultur in Most.
Fig. 3b. Entwicklungszustand derselben Zellgruppe nach 2 Stunden (25° C).
Fig. 3c. Entwicklungszustand derselben Zellgruppe nach 7 Stunden (22° C).

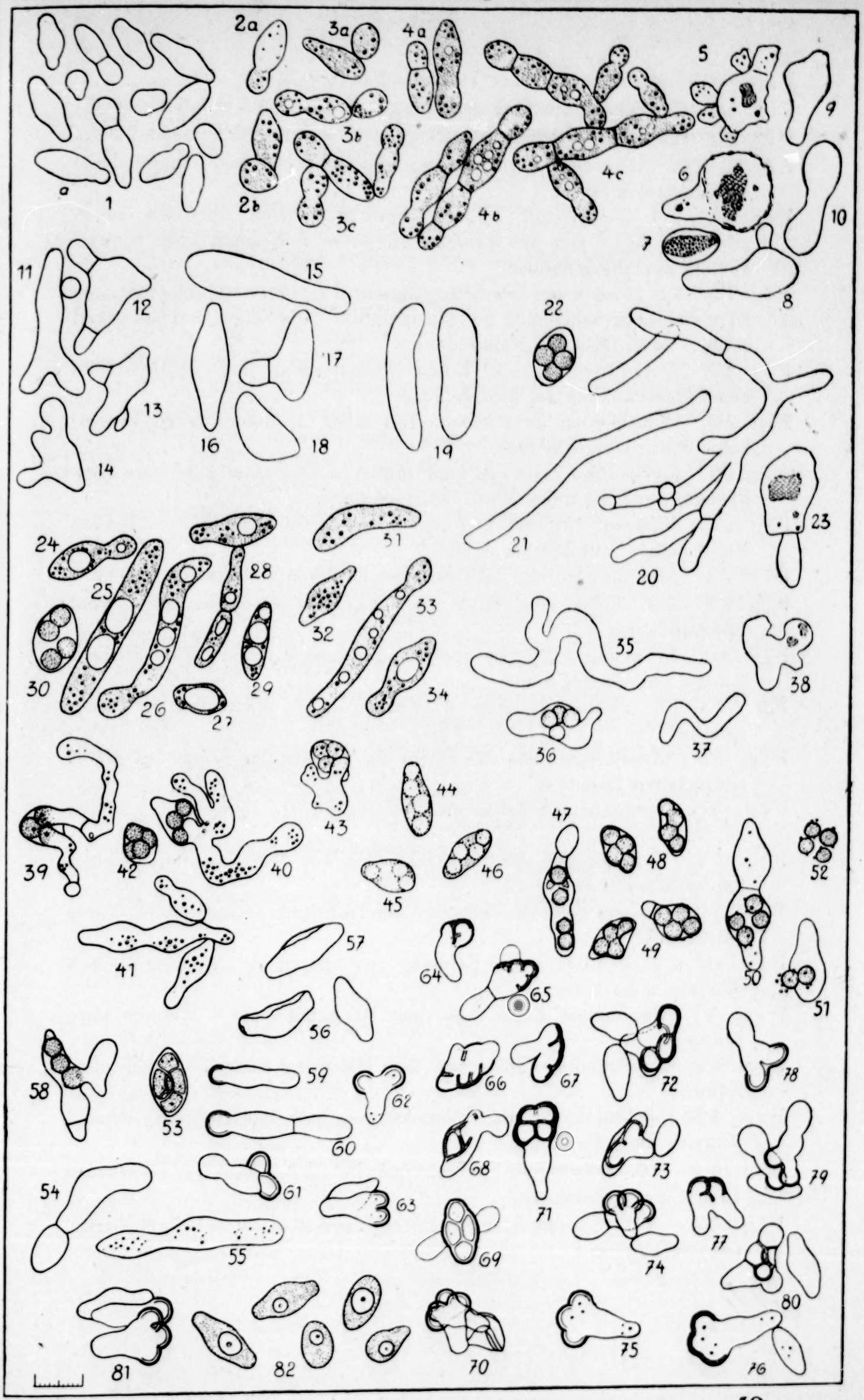

a
1
2a
2b
3a
3b
3c
4a
4b
4c
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82

Fig. 4a. Zellgruppe aus einer Tröpfchenkultur in Most.
Fig. 4b. Entwicklungszustand der Zellgruppe 4a nach 5 Stunden (22° C).
Fig. 4c. Entwicklungszustand der Zellgruppe 4a nach 10 Stunden (22° C).
Fig. 5—10. Abnorme Zellen aus dem mittleren Teil einer Riesenkolonie auf Mostgelatine.
Fig. 11—14. Zellen mit seitlich hervorbrechenden Sprossen bezw. „Kronenbildung" aus den Randpartien einer 7 Wochen alten Riesenkolonie auf Mostgelatine.
Fig. 15—18. Zellen aus der Übergangszone zu den sog. Anhängen am Rande einer Riesenkolonie auf Mostgelatine. Die Zellen sind bedeutend größer als in flüssigen Nährböden.
Fig. 19. Wurstförmige große Zellen (Riesenzellen) von der Unterseite einer Riesenkolonie auf Mostgelatine.
Fig. 20. Mycelbildung im mittleren Teil einer 2 Monate alten Riesenkolonie auf Würzegelatine.
Fig. 21. Mycelartige Zelle aus dem mittleren Teil einer 2 Monate alten Riesenkolonie auf ungehopfter Würzegelatine.
Fig. 22. Zelle mit 4 Sporen aus dem mittleren Teil einer 2 Monate alten Riesenkolonie auf Würzegelatine.
Fig. 23. Abnorm geformte Zelle aus dem mittleren Teil derselben Kolonie.
Fig. 24—29. Zellen vom Rande einer 2 Monate alten Riesenkolonie auf Würzegelatine.
Fig. 30. Zellen mit 4 Sporen vom Rande einer 2 Monate alten Riesenkolonie auf Würzegelatine.
Fig. 31—34. Zellen aus einer 4 Wochen alten Stichkultur in Mostgelatine.
Fig. 35. Mycelartige Zelle aus einem auf ungehopfter Würze bei 20° C entwickelten Hefenring.
Fig. 36. Sporenhaltige Zellen aus dem Hefenring. (Ungehopfte Würze bei 20° C).
Fig. 37. Wurstförmige unregelmäßige Zelle aus dem Hefenring. (Ungehopfte Würze bei 20° C).
Fig. 38. Abnorm geformte Zelle aus dem Hefenring. (Ungehopfte Würze bei 20° C).
Fig. 39 u. 40. Bildung und Keimung von Sporen im Hefenring einer 4 Wochen alten Kultur.
Fig. 41. Sprossende Zellen aus dem Hefenring einer 4 Wochen alten Kultur.
Fig. 42. Sporenhaltige Zellen aus dem Hefenring einer 4 Wochen alten Kultur.
Fig. 43. Sporenbildung und Sporenkeimung aus dem Hefenring einer 4 Wochen alten Kultur.
Fig. 44—46. Beginnende Sporenbildung bei 25,8—26,3° C in 18 Stunden alten Gipsblockkulturen.
Fig. 47—50. Sporenbildung in einer 5 Tage alten bei 22° C gehaltenen. Gipsblockkultur.

Fig. 51. Sporenmutterzelle mit 2 austretenden Sporen.
Fig. 52. Gruppe von 4 Sporen ohne Mutterzellenwandung.
Fig. 53 — 63. Sporenkeimung in Most bei Züchtung in der feuchten Kammer.
Fig. 53. Beginn der Keimung, Anschwellen der Sporen.
Fig. 54 u. 55. Riesenzellen, bei der Keimung aus jungen Zellgenerationen entstanden.
Fig. 56 u. 57. Entleerte Mutterzellen, deren Wandungen zum Teil aufgerissen sind.
Fig. 58. Zelle mit 3 Sporen, von denen eine ein Promycel gebildet hat.
Fig. 59 u. 60. Einzelkeimung einer Spore in 2 verschiedenen Entwicklungsstufen.
Fig. 61. Gruppe von 2 Sporen, von denen eine in Keimung begriffen ist, die andere noch ruht.
Fig. 62 u. 63. Keimung unter Verschmelzung von 2 Sporen.
Fig. 64—69. Auf Brot herangezüchtete, in Most ausgesäte Sporen nach 1—1½ Tagen bei 20—22° C in der Keimung begriffen. Keimung unter sehr frühzeitiger Verschmelzung der Sporen. Die Reste der Sporentrennungswände sind noch sichtbar.
Fig. 70. Keimung von Sporen aus Gipsblockkulturen in Most. Von den 4 Sporen einer Zelle haben je zwei einen gemeinsamen Keimschlauch gebildet. Die entleerte Mutterzelle ist seitlich noch zu erkennen.
Fig. 71. Keimung unter frühzeitiger Verschmelzung der Sporen. Kulturbedingungen wie bei 64—69.
Fig. 72—74. Keimungszustand von Sporen aus Gipsblockkulturen nach Aussaat in Most. Verschiedene Verschmelzungsbildungen.
Fig. 75 u. 76. Keimung von 3 Sporen unter Bildung eines gemeinsamen Keimschlauches.
Fig. 77 — 81. Keimungszustand von Sporen unter ähnlichen Bedingungen wie bei Fig. 72—74. Bei Fig. 81 ist oben noch die Wandung der entleerten Mutterzelle zu erkennen.
Fig. 82. Zellen aus der Bodensatzhefe einer 7 Wochen alten, unter Zusatz von schwefliger Säure angestellten Mostkultur.

Über die verschiedenen Entwicklungszustände der Weinhefen und ihre Merkmale.

Von Dr. E. Elßmann-Geisenheim.

(Mit Tafel II.)

Durch die ausgedehnten Untersuchungen zahlreicher Forscher sind wir heute über die Morphologie und Anatomie der Hefen ziemlich gut unterrichtet. Es sind vor allem auch die äußeren und inneren Veränderungen eingehend studiert worden, welche die Hefenzelle im Laufe ihrer Entwicklung erfährt. Nach dem Vorgange von Wortmann und Meißner pflegt man in den sich mit der Gärungsphysiologie der Weinhefen befassenden deutschen Laboratorien zwischen sprossender, gärender, ruhender oder hungernder und toter Hefe zu unterscheiden. In den Abhandlungen und Lehrbüchern über Bier- und Brennereihefen, wie z. B. dem Will'schen [1]) Buche, findet man den Begriff „gärende Hefe" nicht; dort werden folgende Entwicklungsstadien hervorgehoben: sprossende, ruhende, hungernde und tote Hefe. Da diese Lebensstadien der Hefe in der Betriebskontrolle der Weinkellerei eine wichtige Rolle spielen, z. B. beim Abstich des Weines, bei der Beurteilung von Nachtrübungen des Weines usw. berücksichtigt werden müssen, so erschien es auch von großem praktischen Interesse, die Angaben über die einzelnen Entwicklungsstadien der Weinhefen einer Nachprüfung zu unterziehen.

Bei Meißner [2]) wird die sprossende Hefe beschrieben als aus Zellen bestehend, die nach dem Aufschütteln der Kulturflüssigkeit kleinere oder größere Tochtersprosse führen; Zell-

---

[1]) Will, H., Biologische Untersuchung und Begutachtung von Bierwürze, Bierhefe, Bier und Brauwasser zur Betriebskontrolle sowie zur Hefenreinzucht. 1909.

[2]) Meißner, R., Technische Betriebskontrolle im Weinfach. 1920, S. 23.

inhalt schaumartig mit größeren und kleineren Vakuolen; Aussehen der Zelle mager und weißgrau gefärbt; kleine stark lichtbrechende runde Gebilde (Granula) im Plasma oder in den Vakuolen. Diese Charakterisierung entspricht auch ungefähr meinen Beobachtungen. Von einer schaumartigen Beschaffenheit des Plasmas, auf die übrigens auch Will[1]) hinweist, habe ich mich indes nie recht überzeugen können. Das Plasma ist verhältnismäßig inhaltsarm, wenig lichtbrechend und schwach getönt und führt eine wechselnde Zahl stark lichtbrechender Granula, die man auch in den Vakuolen antreffen kann. Von letzteren weisen die einzelnen Zellen eine verschiedene Zahl auf, kleinere und größere, die nicht immer eine gleichmäßig abgerundete Form haben. Nach Meißner[2]) finden sich weiter in der sprossenden Hefe auch Glykogeneinlagerungen. Er führt das Glykogen sogar für Tochterzellen, die etwa erst ein Fünftel Längendurchmesser der Mutterzelle erreicht haben, ganz allgemein an. Bei Prüfung auf Glykogen an einer großen Zahl Weinheferassen der Geisenheimer Sammlung habe ich das nirgends bestätigt gefunden. Eine Speicherung dieses Stoffes tritt nach meinen Erfahrungen erst dann ein, wenn die Hefenzelle ihre Vermehrungstätigkeit einstellt. Hierin stimme ich mit Will und Wortmann[3]) überein.

Nach Wortmann[3]) und Meißner[2]) geht dann die sprossende Hefe im Laufe der weiteren Entwicklung in die gärende über. Wortmann sagt: „Von dem Zeitpunkte, an welchem die Hefe infolge des entstandenen Alkohols nicht mehr sprossen kann, dagegen noch kräftig weiter gärt, bis zu der Zeit, wo der Zucker verschwunden ist, oder wo aus anderen Gründen die Gärung aufhört, bezeichnen wir die Hefe als gärende Hefe". Er gibt dann weiter an, daß bei mikroskopischer Betrachtung die beiden genannten Lebensstadien der Hefe voneinander unterschieden werden könnten. Gärende Hefe sei besser ernährt, habe ein dichteres und an Substanz reicheres Plasma, das den Zellen einen eigenartigen matten Glanz verleihe. Die Vakuolen schwänden an Zahl und Größe, unter Umständen vermisse man sie

---

[1] Will, H., a. a. O., S. 48.

[2]) Meißner, R., Technische Betriebskontrolle im Weinfach. 1920, S. 29.

[3]) Wortmann, J., Die wissenschaftlichen Grundlagen der Weinbereitung und Kellerwirtschaft. 1905, S. 17.

ganz. Glykogen werde in mehr oder weniger bedeutender Menge in den Zellen aufgespeichert. Im übrigen träte die gärende Hefe hauptsächlich in der Einzellform auf.

Meißner[1]) gibt eine ähnliche Beschreibung der gärenden Hefe. Von den gespeicherten Reservestoffen erwähnt er neben Glykogen auch Fett. Auch weist er darauf hin, daß gärende Hefe im Vergleich zur sprossenden Hefe derselben Rasse größer, dicker sei, und sich besser vom Gesichtsfelde abhebe als letztere. Eine reichliche Speicherung von Glykogen ist nach ihm ein besonderes Charakteristikum dieses Entwicklungsstadiums.

Zu der Glykogenfrage soll in der folgenden Mitteilung Stellung genommen werden. Ich muß aber hier schon darauf hinweisen, daß die Glykogenspeicherung bei den einzelnen Weinheferassen recht verschieden ist, daß es jedenfalls viele Rassen gibt, die Glykogen nur in äußerst geringen Mengen bilden. Wahrscheinlich tritt bei diesen Heferassen eine gewisse Anreicherung mit Fett ein. Im übrigen weisen gerade die schwach Glykogen speichernden Hefen große Vakuolen auf, oft nur eine einzige in der Zelle, die das Plasma auf einen mehr oder weniger dünnen Belag an der Zellwand beschränkt. Bei einigen dieser Rassen fand ich in den großen Vakuolen bei einer beträchtlichen Zahl von Zellen ziemlich regelmäßig die bekannten Einschlüsse, nämlich einen oder mehrere runde, wahrscheinlich fetthaltige Körper, worauf ich in der Mitteilung über Glykogenspeicherung noch näher zu sprechen komme. Diese schwach Glykogen bildenden Heferassen liefern zu gegebener Zeit niemals Bilder, die den von Wortmann und Meißner gegebenen Charakterisierungen für gärende Hefe entsprechen. Sie treffen nur für „Glykogenhefen", wie ich mich einmal kurz ausdrücken möchte, zu.

Ob bei den reichlicher Glykogen speichernden Rassen im gärenden Zustand auch eine Speicherung von Fett in nachweisbaren Mengen stattfindet, möchte ich bezweifeln. Die mit A.-P.-Sudan nach Czapek[2]) ausgeführte Prüfung auf Fett bei sprossender und gärender Hefe hat mir jedenfalls keinen Beweis dafür geliefert. Eine gewisse durchschnittliche Größenzunahme

---

[1]) Meißner, R., a. a. O., S. 29.

[2]) Berichte d. deutschen Bot. Gesellschaft Bd. XXXVII (1919), S. 212: 8 Teile dest. Wasser, 2 Teile Amylenhydrat u. 1 Teil Pyridin gemischt zu Sudanfarbstoff im Reagensrohr gegeben, gut durchgeschüttelt und nach 1 Stunde filtriert.

der Zellen im gärenden Zustande habe ich bei der sehr reichlich Glykogen speichernden Hefe Champagne-Ay (1894) deutlich beobachtet, wie bei Vergleich der Abbildungen 1 und 4 (Taf. II) zu ersehen ist. Die Zahl der Granula, die ich bei sprossender Champagne-Ay-Hefe meist in größerer Zahl im Plasma angetroffen habe, war im gärenden Zustand dieser Hefe eine geringe.

Als hungernde oder ruhende Hefe wird von Wortmann[1]) die nach Beendigung der Gärung am Boden des Kulturgefäßes lagernde Hefe bezeichnet. Er stimmt hier ungefähr mit Will[2]) überein, wobei aber zu bemerken ist, daß Will[2]) hungernde Hefe noch als eigenen Typ heraushebt. Bei einer vergleichenden Betrachtung ist aber wohl auch zu berücksichtigen, daß die allgemeinen Lebensbedingungen für Bierhefe in der Würze wesentlich andere sind als für Weinhefe im Most, besonders nach der Gärung. Zur besonderen Charakterisierung führt Wortmann[1]) die Abnahme an Glykogen und anderen Reservestoffen an, die aber natürlich je nach den Lebensbedingungen früher oder später bemerkbar wird. Daß mit der Verarmung der Zellen an diesen Stoffen auch eine gewisse Größenabnahme erfolgt, glaube ich bestimmt festgestellt zu haben.

Wortmann[1]) gibt dann an, daß sich auf Grund der eben besprochenen Merkmale, besonders mit Rücksicht auf die Glykogenabnahme, eine Unterscheidung der ruhenden Hefe von gärender und sprossender im allgemeinen leicht durchführen lasse. Für Heferassen mit reichlicher Glykogenspeicherung stimme ich dem zu, unter der Voraussetzung, daß eine gewisse Zeit nach der Gärung verstrichen ist. Bei Heferassen mit geringer Glykogenspeicherung dürfte die Unterscheidung aber einigermaßen schwierig, wenn nicht fast unmöglich sein. Nur die mehr oder weniger große Zahl der bereits abgestorbenen Hefen, die man zwischen den ruhenden Hefenzellen anzutreffen pflegt, wird einen bedeutsamen Hinweis zur richtigen Beurteilung des Lebenszustandes der Hefe liefern.

Bei längerer Dauer des Ruhezustandes erfährt dann, wie Will[2]) und Wortmann[1]) angeben, auch das Cytoplasma der Hefenzelle eine allmähliche Abnahme. Es erfolgt eine langsame Aufzehrung desselben, wobei es ein körneliches Aussehen

---

1) Wortmann, J., a. a. O., S. 20.
2) Will, a. a. O. S. 36 bezw. S. 42.

erhält. Ob diese Körnelung des Plasmas immer deutlich hervortritt, möchte ich auf Grund meiner Beobachtungen, die sich allerdings fast ausschließlich auf Reagensglaskulturen beziehen, doch nicht für ganz sicher halten.

Was die Einschlüsse der ruhenden bezw. hungernden Hefenzellen anbelangt, so konnte ich in Übereinstimmung mit Will[1]) Vakuolen in verschiedener Zahl feststellen, oft indes auch nur eine große, wie Will[1]) speziell für die hungernde Hefe angibt. Dieselben traten nicht immer in gleicher Schärfe hervor. Die Zahl der Granula im Plasma war meist eine recht beträchtliche.

Die ruhende Hefe verfällt in dem vergorenen Moste nun früher oder später dem Tode. Es liegt dann die tote Hefe vor, mit der man sich begreiflicherweise besonders eingehend beschäftigt hat, da ihre Erkennung in der Betriebskontrolle des Gärungsgewerbes von großer Wichtigkeit ist. Zwei Möglichkeiten bestehen, tote Hefe als solche zu erkennen; einmal kann das geschehen auf Grund charakteristischer Merkmale der abgestorbenen Zelle, zweitens mit Hilfe von Farblösungen.

Als charakteristisches Merkmal der toten Hefe findet sich im allgemeinen das Zurücktreten des Protoplasten von der Zellwand angegeben. Es wird darauf hingewiesen, daß tote Hefe, sofern sie noch Plasma enthält, häufig eine doppelte Kontur aufweist, d. h. die Zellmembran als äußere und die Umrißlinie des von der Zellwand abgehobenen Protoplasten als innere. Die Zellwand erscheint nach Will[2]) vielfach mehr oder weniger geschrumpft. Glykogen läßt sich normalerweise, wie auch ich bestätigen kann, nicht mehr nachweisen. Die Auflösung des Plasmas schreitet nach Will[3]) bei der toten Hefe immer weiter, wobei es zu einer Verschmelzung einzelner Granula kommt, deren Zahl damit immer kleiner wird. Man kann dann schließlich Zellen beobachten, die innerhalb der Zellwand nur einen größeren oder einige verschieden große öl- und fetthaltige Tropfen aufweisen.

Ich habe im allgemeinen diesen bekannten Beobachtungen nichts hinzuzufügen. Ich kann nur bestätigen, daß — in meinen Kulturen — die abgestorbenen Hefenzellen sich fast immer schon an ihrem Aussehen als solche erkennen ließen.

---

1) Will, H., a. a. O. S. 37 bezw. 43.
2) Will, H., a. a. O. S. 39.
3) Will, H., a. a. O. S. 45.

Als ein Mittel zum Nachweis toter Hefen wird nun in vielen Arbeiten und allen Lehrbüchern, die sich mit Gärungsorganismen befassen, die Anwendung von Farblösungen angegeben. Tote Hefe soll sich bei Einwirkung gewisser Farblösungen sofort stark färben, während die lebenden Zellen zunächst wenigstens ungefärbt bleiben. Bei Durchsicht der Lehr- und Handbücher vermissen wir aber meist genauere Angaben über die Zusammensetzung der zu verwendenden Farblösungen.

In den Lehrbüchern finden sich außer bei Klöcker nur bei Will Zahlenwerte angegeben. Klöcker[1]) sagt: „Nach Wehmer kann man eine ½ prozentige Methylenblau-Lösung verwenden, indem die toten Zellen sich damit indigoblau färben, während die lebenden Zellen farblos bleiben." Will[2]) empfiehlt eine wässerige Methylenblau-Lösung in der Verdünnung 1 : 10 000. H. Zikes[3]) geht in einer Arbeit „Die Fixierung und Färbung der Hefen" auch auf die Frage der Färbung von toten und lebenden Hefen ein. Er wendet selbst die Willsche Verdünnung einer Methylenblau-Lösung an. Von dieser gibt er in ein kleines Schaugläschen zur Hefesuspension soviel, bis die Flüssigkeit deutlich gefärbt erscheint, worauf er mittels einer Platinöse eine Probe zur mikroskopischen Untersuchung entnimmt. Bei diesem Verfahren ergibt sich aber natürlich eine noch schwächere Konzentration der Farblösung als 1 : 10 000. Wie auch Zikes anführt, sind ferner Eosin, Methylviolett, Fuchsin und Gentianaviolett in Konzentrationen von 0,5—2 % zur Feststellung toter Hefe angewandt worden, auch hat man Indigokarmin in einer Lösung 1 : 30 für diese Zwecke gebraucht. Hinzuweisen ist noch auf eine Arbeit von E. Schlichting und H. Winther[4]), die eingehende Studien zur Ausarbeitung einer exakten Methode für die Feststellung toter Hefe mittelst Farblösungen angestellt haben. Sie ließen Lösungen von Methylenblau (1 : 200 und 1 : 1000) und Indigokarmin (1:30) in bestimmten Mengenverhältnissen auf Hefeauf-

1) Klöcker, A., Die Gärungsorganismen in der Theorie u. Praxis der Alhoholgärungsgewerbe, 1906, S. 75.

2) Will, H., a. a. O., S. 38 und Anhang.

3) Zikes, H., Die Fixierung und Färbung der Hefen. Zentralbl f. Bakt. II. Bd. 31 (1912), S. 529.

4) Schlichting, E. u. Winther, H., Nation. Brewers Acad. New-York; Intern. Kongreß f. angew. Chemie, London.

schwemmungen einwirken, deren Zellenzahl annähernd bekannt war, und prüften ihre Beobachtungen mit Hilfe der Lindnerschen Tröpfchenkultur nach. Das Ergebnis ihrer Untersuchungen war, daß bei Anwendung von 0,06 ccm der 1 : 1000 Methylenblau-Lösung und 1 ccm der 40 000 Zellen enthaltenden Hefesuspension zuverlässige Resultate erzielt wurden. Indigokarmin (in der Verdünnung 1 : 30) lieferte im allgemeinen noch bessere Ergebnisse als die Methylenblau-Lösungen.

Nun ist aber wohl eines zu berücksichtigen, daß tatsächlich bei Ausführung der Prüfung nicht Methylenblau-Lösungen 1 : 1000 bezw. Indigokarmin-Lösungen 1 : 30 auf die Zellen einwirken, sondern wesentlich dünnere Lösungen. So errechnet sich z. B. für die Methylenblau-Lösung etwa eine Konzentration 1 : 16 000.

Jedenfalls zeigen die Untersuchungen der beiden Forscher deutlich, daß man in der Wahl der Konzentration der Farblösungen recht vorsichtig sein muß, um nicht auf Grund des Färbungsergebnisses zu einem unrichtigen Urteil zu kommen. Mit Recht hat daher schon Will[1]) hervorgehoben, daß nur sehr verdünnte Lösungen von Anilinfarbstoffen anzuwenden seien, da bei längerer Einwirkung selbst verdünnter Lösungen sich schon Giftwirkungen bemerkbar machen. Andererseits darf man wohl unter Berücksichtigung der von Schlichting und Winther erhaltenen Resultate annehmen, daß das Konzentrationsoptimum für die einzelnen Farbstoffe recht verschieden sein kann.

Ich selbst prüfte folgende Farbstoffe auf ihre Brauchbarkeit zum Nachweis toter Hefen : Methylenblau-Ehrlich, Methylviolett, Gentianaviolett, Fuchsin und Indigokarmin (in Pastenform)[2]).

Bei der Untersuchung wurde stets eine Öse Bodensatzhefe aus einer Reagensglaskultur mit etwa 0,2 ccm Farblösung auf dem Objektträger gemischt, dann sofort ein Deckgläschen aufgelegt und die überschüssige Farblösung abgesaugt. Die so erhaltenen Präparate wurden sofort mikroskopisch untersucht.

---

1) Will, H., a. a. O., S. 38.

2) Von den Farbstoffen (mit Ausnahme von Indigokarmin) stellte ich mir alkoholische Lösungen (Stammlösungen). 1 : 100 her. Diese benutzte ich jeweils für die verschiedenen Verdünnungen.

Stets wurden dabei Hefezuchten verschiedenen Alters miteinander verglichen.

Es stellte sich dabei heraus, daß sowohl Methylenblau- wie Fuchsin-Lösungen in Konzentrationen von 1 : 10 000 zum Nachweis toter Hefen gut geeignet sind. Die Farbreaktion führt dabei zu sicheren Ergebnissen, denn es konnte mittels Tröpfchenkulturen gezeigt werden, daß beim Uebertragen in Most die farblos gebliebenen Zellen sofort zu sprossen beginnen, die gefärbten Zellen dagegen unverändert bleiben. Daß eine Lebendfärbung von Weinhefezellen mit den von mir verwendeten Methylenblau-Lösungen möglich sein sollte, halte ich nach den ziemlich ausgedehnten Untersuchungen, die ich mit verschiedenen Konzentrationen und bei verschieden langer Einwirkung der Farblösung angestellt habe, für sehr zweifelhaft. Brauchbar sind auch Lösungen von Methylviolett und Gentianaviolett, doch dürfen von diesen Farbstoffen nur Verdünnungen von 1 : 20 000 verwendet werden. Stärkere Konzentrationen rufen in den Präparaten Flockenbildungen hervor, die sehr störend wirken.

Auch gesättigte Lösungen von Indigokarmin sind recht brauchbar. Vergleichspräparate, die ich in eine feuchte Kammer legte und nach 2 bezw. 24 Stunden untersuchte, ergaben keinen Anhalt dafür, daß sich im Laufe dieser Zeit noch ein merkbarer Prozentsatz an Zellen nachgefärbt hatte. Die Färbung toter Zellen mit Indigokarmin ist im übrigen schwächer als mit Methylenblau.

Bei Anwendung konzentrierterer Farblösungen, wie etwa 0,5 bis 2 prozentiger Lösungen von Methylviolett, Gentianaviolett und Fuchsin, ergaben sich nach meinen Beobachtungen mehr oder weniger große Unregelmäßigkeiten. Im übrigen waren schon bei niedrigeren Konzentrationen dieser Farbstoffe die Ausflockungen im Präparat außerordentlich störend und ließen eine genaue Beurteilung des mikroskopischen Bildes überhaupt nicht mehr zu.

Auch die nach Klöcker von Wehmer angegebene Konzentration für Methylenblau (1 : 200) ist bei Untersuchung von Hefen, die sich im Most entwickelt haben, zu stark, um sichere Resultate zu geben, wie das auch aus den Untersuchungen von Schlichting und Winther hervorgeht. Bei dem Nachweis toter Hefenzellen mit Farblösungen dürfen demnach im allgemeinen

nur sehr schwache Konzentrationen in Anwendung kommen, Konzentrationen, die für Methylviolett und Gentianaviolett 1 : 20 000, für Methylenblau und Fuchsin 1 : 10 000 nach oben nicht überschreiten sollten.

Für die Betriebskontrolle in der Weinkellerei hat nun auch die Erkennung der durch Pasteurisieren abgetöteten Hefe ein gewisses Interesse. Solche Hefen werden sich natürlich schon durch die sofortige Färbung bei Zugabe verdünnter Farblösungen als tote zu erkennen geben. Es wird sich aber nun fragen, ob sie sich auch nach Form und Aussehen ihrer Zellen als abgetötet bestimmen, und inwieweit sie sich eventl. von solchen Hefen unterscheiden lassen, die in der vergorenen Nährflüssigkeit infolge von Nährstoffmangel oder anderen Einwirkungen allmählich abgestorben sind.

Die im folgenden besprochenen Untersuchungen wurden mit den Weinheferassen Champagne-Ay 1894, Steinberg 1892, Winningen 1892 und Oberingelheimer Rotwein 1892 ausgeführt. In der Hauptsache arbeitete ich allerdings mit der Champagne-Ay-Hefe, die anderen wurden nur zum Vergleich herangezogen. Die Hefen kultivierte ich bei einer Temperatur von 15—18° C in Reagensröhrchen, die je 10 ccm gezuckerten Trestermost enthielten. Ich gebrauchte jeweils für jede Heferasse 4 gleiche Kulturen, da ich einmal die Hefe in sprossendem, dann im gärenden und schließlich im ruhenden Zustand abtöten wollte. Das 4. Röhrchen blieb mir dann stets zum Vergleich der abgetöteten Hefe mit der gleichalterigen lebenden. Das Abtöten geschah in allen Fällen durch Einstellen der Röhrchen in Wasser von Zimmertemperatur, das dann auf 80° C erhitzt und auf dieser Temperatur ½ Stunde gehalten wurde.

Die durch Pasteurisieren abgetötete sprossende Hefe erscheint durchschnittlich kleiner als im lebenden Zustand. Der Unterschied war sehr augenfällig und ist auch aus den Abbildungen (Taf. II) 1 und 2 zu ersehen. Die Hefe schrumpft beim Abtöten, was ja auch sonst beim Absterben der Hefe sich mehr oder weniger deutlich bemerkbar macht. Ein großer Teil der Zellen ist noch mit kleinen und größeren Tochtersprossen versehen. Die Vakuolen zeigen sich weniger umfangreich, etwas unregelmäßig in ihrer Form, treten aber doch im allgemeinen scharf abgegrenzt hervor. Die kleineren Vakuolen sind wohl

z. T. überhaupt geschwunden, d. h. durch die Kontraktion des Plasmas zusammengedrückt worden. Das Plasma erscheint dichter, von dunklerer Tönung und hat meist ein ziemlich gleichmäßiges Aussehen. Einzelne granulaartige Punkte lassen sich fast immer erkennen. Häufig stellt man solche gerade in den Vakuolen fest, in denen oft auch verschieden gestaltete faden- oder strangförmige Zeichnungen zu erkennen sind. Der Umriß der Zellen ist meist etwas unregelmäßig. Besonders da, wo eine größere Vakuole vorhanden ist, oder eine solche exzentrisch der Zellwandung nahe liegt, findet sich eine kleine Einbuchtung in der Umrandung der Zelle.

Ein Zurücktreten des Protoplasten von der Zellwand ist im allgemeinen nicht scharf zu erkennen. Bei sehr vielen Zellen ist die Ablösung des Plasmas von der Zellmembran auch nur auf einzelne Stellen und kurze Strecken lokalisiert. An vielen anderen Zellen schien der Protoplast überhaupt nicht von der Zellwand abgesetzt. Doch waren auch Zellen mit doppelter Kontur zu beobachten, bei denen also das Plasma ringsum sich von der Membran losgelöst hatte. Jedenfalls bedurfte es im Einzelfalle immer genauer Beobachtung, um da, wo der Protoplast zurückgetreten war, die Randlinien desselben und die Zellmembran als solche zu erkennen, was vermutlich auch mit der in diesem Lebensstadium der Hefe noch verhältnismäßig geringeren Stärke der Zellwand zusammenhängt. Die Unterschiede zwischen lebender und toter Hefe waren, soweit wenigstens meine Untersuchungen reichen, deutlich genug, um auch ohne Anwendung von Färbungsmethoden ein Urteil, ob die Zellen lebend oder tot sind, fällen zu können.

Bei der abgetöteten gärenden Hefe zeigte sich gleichfalls ein in fast allen Zellen ziemlich übereinstimmendes charakteristisches Bild. Die Zellen dürften auch hier im allgemeinen etwas kleiner geworden sein. Fast bei allen war der Protoplast ringsum gleichmäßig von der Zellwand zurückgetreten, so daß eine doppelte Kontur zu sehen war. Der Protoplast, von mattgrauer dunkler Tönung, erschien eigenartig wabig, netzförmig gezeichnet. Anscheinend war das Netzwerk von dem beim Erhitzen der Kulturflüssigkeit geronnenen Plasma gebildet. Denn dieses Netzwerk trat nach der Färbung mit einer verdünnten Jodjodkalium-Lösung als gelbliches Strang- oder Fadenwerk

zwischen den ausgedehnten rotbraungefärbten Partien der Zelle hervor. Es erfolgte im übrigen auch bei der abgetöteten, gärenden Hefe eine dem lebenden Zustand entsprechende starke Reaktion auf Glykogen. Jedenfalls ergibt sich auch bei abgetöteter, gärender Hefe, soweit es sich um glykogenreiche Zellen handelt, ein recht eigenartiges Bild, das bei einiger Übung die Unterscheidung derselben von lebender, gärender Hefe möglich macht. Für glykogenarme Hefen trifft indes das im folgenden über ruhende Hefe Gesagte im allgemeinen mit zu.

Bei den durch Pasteurisieren abgetöteten ruhenden Hefen bemerkt man fast immer ein deutliches Zurücktreten des Protoplasten von der Zellwand, vielfach ist sogar der Protoplast von der Zellwand sehr stark abgesetzt (Abb. 9, Taf. II). Die Membran, deren Stärke im Vergleich zur sprossenden Hefe merklich zugenommen hat, läßt sich gut erkennen. Der Protoplast erscheint als ziemlich stark lichtbrechender, zu unregelmäßigen Formen verdichteter Körper, in dem sich noch da und dort Granula abzuheben scheinen. Unterbrochen wird der Protoplast von kleineren und größeren hellen Stellen, die wohl auf Vakuolen zurückzuführen sind. Der Zellinhalt in seiner Gesamtheit zeigt sich ziemlich durchsichtig. Die helleren Stellen sind häufig unterbrochen von isolierten Teilen des Plasmas und wohl auch öl- bezw. fetthaltigen Tropfen.

Ganz ähnliche Bilder ergaben sich nun aber auch bei Hefenzellen, die in vergorenen Flüssigkeiten allmählich abgestorben sind (Abb. 12, Taf. II). Irgendwelche greifbaren Unterscheidungsmerkmale zwischen diesen und durch Erhitzen abgetöteter ruhender Hefe habe ich nicht beobachten können.

Bei meinen Untersuchungen achtete ich auch auf den Gehalt der Hefenzellen an Fett und Volutin. Letzteres ist bekanntlich durch A. Meyer [1]) bei Bakterien, Pilzen und auch Saccharomyceten nachgewiesen worden und wird von ihm als Reservestoff aufgefaßt. Henneberg [2]) hat diesem Körper die Bedeutung eines Gärenzyms beigelegt, während Herwerden [3])

---

[1]) Bot. Zeitung 1904, S. 113.

[2]) Zentralbl. f. Bakt. II. Bd. 45 (1916), S. 50.

[3] Herwerden, M. A. v., Über die Natur und die Bedeutung von Volutin in den Hefezellen. Refer. in Zentralbl. f. Bakt. II. Bd. 49 (1919), Seite 320.

neuerdings auf Grund eigner Untersuchungen zu der Ueberzeugung gekommen ist, daß das Volutin weder für das Leben und die Vermehrung der Zellen noch für die Gärung notwendig sei. Außer Guilliermond hat sich auch Kroemer[1]) mit dem Nachweis des Volutins in Weinhefenzellen befaßt. Kroemer hat das Volutin bei allen von ihm untersuchten Weinheferassen vorgefunden und zwar sowohl bei sprossender, gärender und ruhender Hefe. Ich habe dem nichts Neues hinzuzufügen und kann mich kurz fassen. Bei den von mir geprüften Hefen Champagne-Ay, Winningen und Oberingelheimer Rotwein gelang gleichfalls bei allen Entwicklungsstadien der lebenden Hefe der Volutinnachweis. Ich wandte das von A. Meyer[2]) angegebene Verfahren mit Methylenblau und Schwefelsäure an. Bei bereits abgestorbenen Hefenzellen bekam ich keine Reaktion, ebenso verlief die Prüfung bei Hefe, die durch Erhitzen auf 80° C abgetötet war, stets negativ. Schon Meyer[2]) stellte fest, daß Volutin in Wasser von 80—100° C in einigen Minuten gelöst wird.

Der Fettnachweis wurde mit Hilfe des von Czapek empfohlenen A.-P.-Sudan geführt. Dieses Reagens ist für den Nachweis des Fettes in den Hefenzellen nach meinen Beobachtungen sehr gut geeignet. Ich zentrifugierte in einem Röhrchen eine Probe der Hefeaufschwemmung, goß ab, setzte 0,5 ccm von dem Reagens zu, schüttelte die Hefe tüchtig auf, ließ über Nacht stehen und wusch nach Abgießen der Farblösung die Hefe mit dest. Wasser aus.

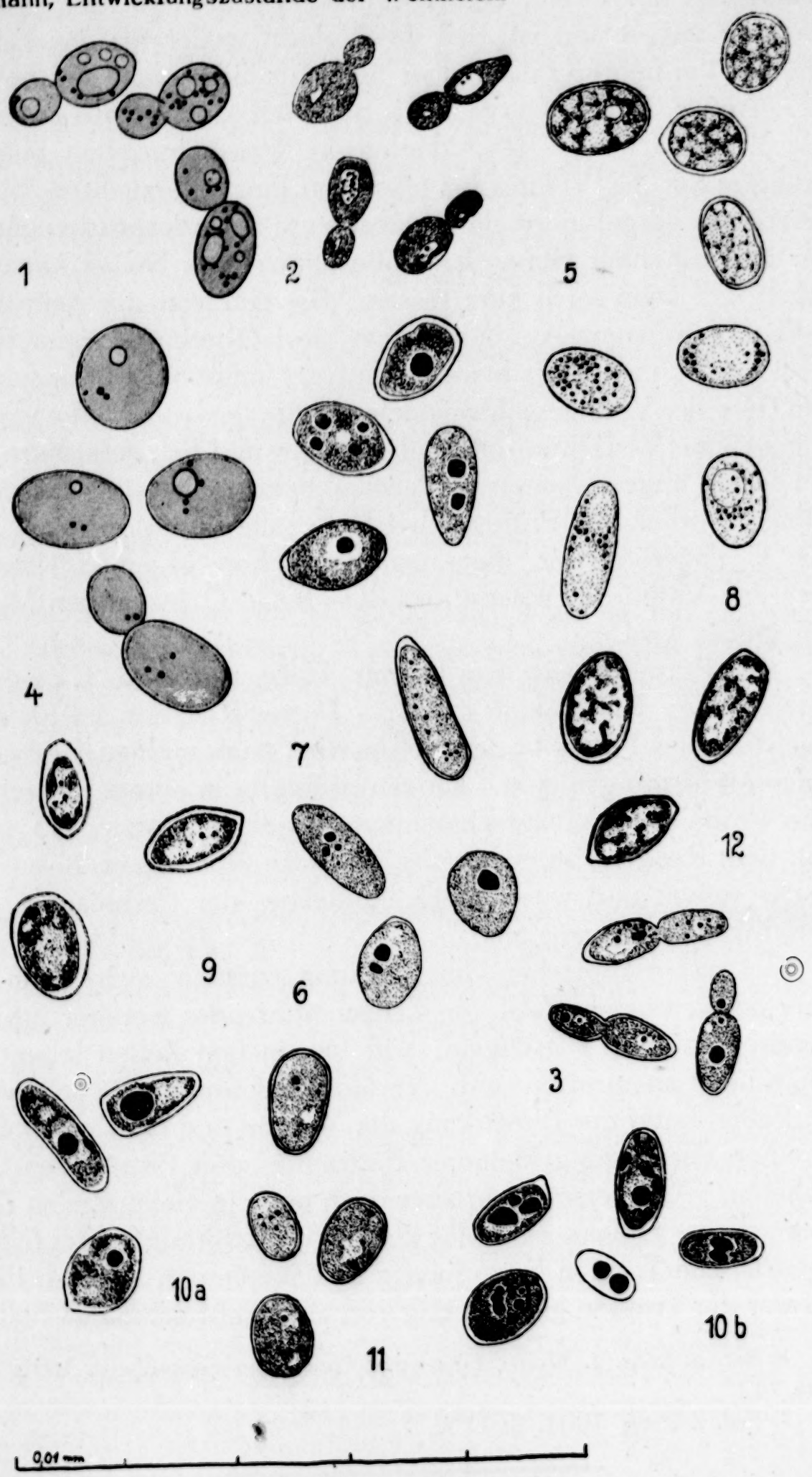
Bei mikroskopischer Untersuchung zeigten sich dann in einer beträchtlichen Zahl von Zellen mehr oder weniger große, ziegelrot gefärbte Fettkugeln, wie sie in den Zellen lebender Hefen nicht anzutreffen sind. Vermutlich kommt es in sehr vielen Fällen unter der Einwirkung der Wärme und der Farblösung zu einer Vereinigung kleinerer Fettropfen und Fettmassen zu größeren. Andererseits war aber doch auch in vielen Zellen das Fett auf eine größere Zahl sehr kleiner, punktförmiger Tröpfchen verteilt. Die Tropfen lagen häufig in Vakuolen, in anderen Fällen war der Tropfen gleichmäßig von einer sehr schmalen hellen

---

1) Ber. d. Lehr. f. Wein-, Obst- und Gartenbau Geisenheim 1916/17, Seite 112.

2) Bot. Zeitung 1904, S. 113.

Elßmann, Entwicklungszustände der Weinhefen. Tafel II.



Zone umgeben, während schließlich auch rings dicht vom Plasma eingeschlossene Tropfen beobachtet wurden. In einigen Zellen sah ich eine ganz periphere Lagerung eines Fettropfens, der dem Rande des von der Wandung abgesetzten Protoplasten wie ein kleiner Tautropfen ansaß. Gerade diese Fälle deuten auf eine Verlagerung des Fettes unter der Einwirkung der Hitze und der Farblösung hin.

Auch das Fett wurde bei den Weinhefen in allen Lebensstadien festgestellt. Bei sprossender und gärender Hefe fand ich den Fettgehalt durchschnittlich annähernd gleich, während sich bei ruhender im allgemeinen ein etwas höherer Gehalt an Fett offensichtlich ergab. Lebende und abgetötete Hefe zeigte die Reaktion in gleicher Stärke. Die in vergorenen Flüssigkeiten abgestorbene Hefe erwies sich ebenso reich an Fett wie ruhende; bei ersterer traf man in wechselnder Zahl Zellen, deren Inhalt nur aus Fett in Form eines oder einiger Tropfen bestand. Das Protoplasma war dann bereits durch Auflösung geschwunden.

Wir sehen somit, daß auch die Prüfung auf Volutin und Fett kein greifbares Merkmal an die Hand gibt, um durch Erhitzen abgetötete ruhende Hefe und Hefe, die in vergorenen Flüssigkeiten infolge Nährstoffmangels abgestorben ist, unterscheiden zu können. Nur das Aussehen der durch Pasteurisieren abgetöteten sprossenden und gärenden Hefe, soweit sie reichlich Glykogen gespeichert hat, ist derart bestimmt, daß eine Unterscheidung von letzterer möglich ist.

Erklärung der Tafel II.

1. Heferasse Champagne-Ay (1894). Sprossende Hefe.
2. „ „ „ „ „ „ durch Erhitzen abgetötet.
3. Heferasse Oberingelheimer Rotwein (1894). Sprossende Hefe. Fettnachweis mit A.-P.-Sudan nach Czapek.[1])
4. Heferasse Champagne-Ay (1894). Gärende Hefe.
5. „ „ „ „ „ „ durch Erhitzen abgetötet.
6. Heferasse Champagne-Ay (1894). Gärende Hefe, Fettnachweis mit A.-P.-Sudan nach Czapek.[1])
7. Heferasse Winningen (1892). Gärende Hefe, Fettnachweis mit A.-P.-Sudan nach Czapek.[1])
8. Heferasse Champagne-Ay (1894). Ruhende Hefe.
9. „ „ „ „ „ „ durch Erhitzen abgetötet.
10 a. „ „ „ „ „ „ Fettnachw. n. Czapek.[1])
10 b. „ „ „ „ Fettnachweis bei der durch Erhitzen abgetöteten Hefe.[1])
11. Heferasse Oberingelheimer Rotwein (1894). Ruhende Hefe, Volutinnachweis. Schwarze Punkte = Volutin.
12. Heferasse Champagne-Ay (1894). Im Kulturröhrchen abgestorben.

[1]) Die schwarzen Punkte und größeren Flecken zeigen Fett an.

Zur Frage der Glykogenspeicherung bei den Weinhefen.

Von Dr. E. Elßmann-Geisenheim.

Über das Vorkommen und die Verteilung des Glykogens in den Zellen der Hefen liegen bereits mehrere Untersuchungen vor. Ebenso sind die Bedingungen, unter denen die Glykogenbildung bei den Hefen erfolgt, von verschiedenen Forschern studiert worden. Wie Laurent[1]), Kayser und Boullanger[2]), Cremer[3]) und Henneberg[4]) festgestellt haben, hängt dieselbe hauptsächlich von der Temperatur, dem Luftzutritt und der Zusammensetzung des Nährbodens ab, auf dem bezw. in dem die Hefe sich entwickelt. Henneberg hat auch darauf hingewiesen, daß nicht von allen Individuen einer Reinkultur Glykogen in gleichem Maße gespeichert wird, eine Erscheinung, die nach meinen Beobachtungen auch für Weinhefekulturen zutrifft. Ein mehr oder minder großer Prozentsatz der Zellen bleibt auch in den Zuchten dieser Hefen anscheinend frei von Glykogen.

Henneberg[5]) und Will[6]) haben ferner darauf hingewiesen, daß das Vermögen der Glykogenbildung auch bei den einzelnen Rassen der Bier-, Brennerei- und Preßhefen verschieden entwickelt ist, dagegen war bisher noch nichts darüber bekannt, wie sich die verschiedenen Rassen der Weinhefen in die-

---

1) Ber. d. Deutsch. Bot. Ges. 1887, Bd. 5, S. 500.

2) Kayser, Ed. u. Boullanger, E., Etude s. l. ferments nat. de l'hydromel. Paris 1897; ref. in Kochs Jahresbericht 1897, Bd. 8, S. 136.

3) Cremer, M., Z. f. Biol., 1894, Bd. 31, S. 183.

4) Henneberg, W., Z. f. Spiritusindustrie, 1902, Bd. 25, S. 378 u. W. f. Brauerei, 1902, Bd. 19, S. 781.

5) Henneberg, W., Gärungsbakteriologisches Praktikum, Betriebsuntersuchungen u. Pilze, 1909. S. 200

6) Will, H., Biol. Untersuchung u. Begutachtung von Bierwürze, Bierhefe, Bier- und Brauwasser zur Betriebskontrolle sowie zur Hefenreinzucht, 1909, Seite 40.

ser Beziehung verhalten. Die nicht immer günstigen Ergebnisse, die ich bei dem Versuch erzielte, in diesen Hefen Glykogen nachzuweisen, veranlaßten mich zu einer Prüfung der Frage, ob auch bei den Rassen der Weinhefen Unterschiede in der Fähigkeit der Glykogenbildung auftreten.

Die erforderlichen Untersuchungen wurden ausgeführt mit den nachfolgenden Rassen der Geisenheimer Sammlung:

1. Aßmannshäuser Rotwein 1892
2. Johannisberg 1893
3. Steinberg 1892
4. Steinberg 1893
5. Schloß Vollrads 1894
6. Oberingelheimer Rotwein 1894
7. Oppenheimer Kreuz 1894
8. Bingen-Scharlachberg 1895
9. Forster 1893
10. Scharzhofberg 1893
11. Ahrweiler 1892
12. Winningen 1892
13. Zeltingen 1895
14. Würzburger Stein 1892
15. Auslesehefe 1920
16. Bordeaux 1893
17. Champagne-Ay 1894

Als Anzuchtflüssigkeit dienten wässerige Auszüge von Trestern mit einem Gehalt von 10 g Zucker in 100 ccm [1]).

Die Hefen wurden in Reagensgläsern herangezüchtet, die je 10 ccm gezuckerten Trestermost enthielten. Der Zuckergehalt des letzteren war durch Zusatz von Rohrzucker auf 10 g in 100 ccm erhöht worden. Die Röhrchen wurden mit einer Oese Hefe aus gleichalten Kulturen geimpft und dann in einen

[1]) Tresterauszüge werden von Prof. Kroemer seit mehreren Jahren mit bestem Erfolg zur Anzucht von Weinhefen benutzt. Die Herstellung geschieht in der Weise, daß die beim Keltern der Trauben zurückbleibenden Preßrückstände mit Wasser im Verhältnis von 50 kg Trester zu 100 Liter Wasser zwei Tage lang bei einer Temperatur von 15° C ausgelaugt und dann wieder abgepreßt werden. Die von der Kelter ablaufenden Auszüge, die neben anderen Extraktstoffen meist noch 1—2,5% Zucker enthalten, werden sofort in Flaschen abgefüllt und pasteurisiert. Vor der Verwendung im Laboratorium werden die Auszüge nach Bedarf gezuckert

Brutschrank gestellt, dessen Temperatur zwischen 15 und 18° C schwankte. Am dritten Tage nach der Aussaat stellte sich bei allen Kulturen Kohlensäureentwicklung ein, abgesehen von den Rassen Würzburger Stein und Auslesehefe 1920, bei denen erst am vierten Tage Anzeichen von Gärung bemerkbar wurden.

Die Prüfung der Hefen auf Glykogen wurde mit der von H. Will angegebenen Jodlösung [1]) vorgenommen am 4., 8., 12., 16. und 19. Tage nach der Aussaat.

Am 4. Tage war das Ergebnis der Prüfung in allen Fällen durchaus negativ. Sämtliche Kulturen enthielten um diese Zeit sprossende Hefen.

Die Untersuchungen vom 8. und 12. Tage führten zu folgenden Resultaten:

Rasse:	
Aßmannshäuser Rotwein:	In sehr vielen Zellen Glykogenreaktion. „Reaktion gut".
Johannisberg:	„Reaktion gut bis mäßig". Sehr viele Zellen nur mit Spuren von Glykogen oder ohne Glykogen; viele Zellen mit großen Vakuolen, in denen vielfach ein großer, möglicherweise fetthaltiger Vakuolkörper zu sehen war.
Steinberg 1893:	„Reaktion gut bis mäßig". Entspricht etwa der Johannisberger Hefe.
Schloß Vollrads:	„Reaktion gut".
Oberingelheimer Rotwein:	„Reaktion sehr gut". Reichlich Glykogen in den Zellen.
Oppenheimer Kreuz:	„Reaktion gut bis sehr gut".
Bingen-Scharlachberg:	„Reaktion sehr mäßig". Nur in verhältnismäßig wenigen Zellen schwache Glykogenreaktion. Viele Zellen mit großen Vakuolen.
Forster:	„Reaktion sehr gut".

[1]) 12,7 g Jodkalium, 6,35 g Jod, 1 l Wasser.

Scharzhofberg:	„Reaktion mäßig". Viele Zellen mit großen Vakuolen.
Ahrweiler:	„Reaktion mäßig". Auch hier viele Zellen mit großen Vakuolen, in denen vielfach ein größeres Körperchen (Ölkörperchen nach Will!) zu sehen war.
Zeltingen:	„Reaktion gut bis sehr gut".
Würzburger Stein:	„Reaktion mäßig".
Auslesehefe 1920:	„Reaktion fast fehlend". Von einzelnen Zellen abgesehen keine Reaktion. Eine kleinzellige Hefe, bei der die Gärung verhältnismäßig spät bemerkbar wurde.
Bordeaux:	„Reaktion mäßig bis sehr mäßig". Viele Zellen mit großen Vakuolen.

Ungefähr dasselbe Ergebnis hatte die Untersuchung vom 16. und 19. Tage. Das Bild der Glykogenspeicherung hatte sich nicht oder nur unwesentlich geändert.

Aus diesen Beobachtungen ergibt sich, daß das Glykogenbildungsvermögen der einzelnen Weinheferassen außerordentlich verschieden ist. Einzelne Rassen, wie Oberingelheimer Rotwein, Forster, Steinberg 1892 und Champagne-Ay zeichnen sich durch starke Glykogenbildung aus, andere bilden nur sehr geringe Mengen dieses Reservestoffes. Zu diesen Hefen gehören die Rassen Bingen-Scharlachberg, Würzburger Stein und die Auslesehefe 1920. Wieder andere Stämme [1]) nehmen in bezug auf Glykogenbildung eine Mittelstufe ein.

Wenn also in einzelnen Lehrbüchern angegeben wird, daß sich die Weinhefen „im gärenden Zustande" durch mehr oder weniger starken Glykogengehalt auszeichnen, so ist das insofern nicht ganz genau, als dieses Merkmal nur bei bestimmten Heferassen, nämlich den Glykogen speichernden, vorkommen dürfte.

---

[1]) Zu diesen gehört auch nach weiteren Beobachtungen die Rasse Winningen.